Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Zur Frage der Belastbarkeit der Glucuronid- und Sulfatkonjugation bei der Fremdstoffentgiftung

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Gerhard Panke
aus Fürstenwalde

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Zur Frage der Belastbarkeit der Glucuronid- und Sulfatkonjugation bei der Fremdstoffentgiftung

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Gerhard Panke

aus Fürstenwalde

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Angenommen von der medizinischen Fakultät
am 19.11.1968
Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan : Prof. Dr. med. W. Straub
Referent : Prof. Dr. med. W. Schmid
Koreferent : Prof. Dr. med. M. Siess

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Methode	1
	1. Tiermaterial	1
	2. Versuchsanordnung	2
	3. Glucuronidbestimmung	3
	4. Sulfatbestimmung	4
	5. Substanzen und Applikationsart	4
	6. Statistische Auswertung	5
III.	Ergebnisse	6
	1. Kontrolltiere	6
	2. Chloralhydrat	6
	3. Phenol	10
	4. Natriumsalicylat	13
	5. N-acetyl-p-aminophenol (NAPAP)	14
	6. Kombination der einzelnen Substanzen	15
IV.	Diskussion	19
V.	Tabellen 1 - 7	31
VI.	Zusammenfassung	43
VII.	Literatur	44

I. Einleitung

Mit der ständigen Erweiterung der medikamentösen Therapie gewinnt die Frage nach den Möglichkeiten des Organismus, die verschiedensten chemischen Verbindungen mit zum Teil ganz differenten Wirkungen zu inaktivieren und zu eliminieren, ein zunehmendes Interesse. Eine der Möglichkeiten, körperfremde Substanzen, aber auch im Organismus selbst natürlicherweise anfallende Stoffwechselprodukte in ihrer Wirksamkeit zu verändern und in eine zur Ausscheidung geeigneteren Form zu bringen, ist die Kopplung mit verschiedenen im Stoffwechsel zur Verfügung stehenden Verbindungen. Unter den zahlreichen Möglichkeiten steht im Vordergrund die Konjugation mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure. (Übersicht über das Problem der Entgiftung: WILLIAMS 1959[42] und 1961[43]; LEUTHARDT 1960[25]; REMMER 1966[32]). Da die Konjugation durch relativ unspezifische Enzyme katalysiert wird, kann ein großes Spektrum verschiedenster Verbindungen erfaßt werden, eine Tatsache, ohne die eine wirkungsvolle Fremdstoffentgiftung gar nicht denkbar wäre. Besonderes Interesse verdient die Kopplung mit Glucuronsäure, da ein Versagen dieses Ausscheidungsmechanismus sowohl physiologisch bei Neugeborenen (es sei an das Grausyndrom nach Chloramphenicolmedikation erinnert), als auch pathologisch als Glucuronyltransterasemangel bekannt ist (Crigler-Najjar-Syndrom; M. Menlengracht). Auch bei Versuchstieren ist ein solcher Fermentmangel bekannt (SCHMID, R. 1960[34]; DUTTON 1959[13]).

Es ist das Anliegen dieser Arbeit, einen Beitrag zu der Frage zu leisten, wie weit diese Ausscheidungsmechanismen belastbar sind, zumal gerade die Glucuronidbindung als ziemlich unspezifisch und unempfindlich gilt.

II. Methode

1. Tiermaterial: Es wurden weiße Ratten vom Stamme Wistar mit einem mittleren Gewicht von etwa 300 g (270-350 g) verwendet. Kleinere Tiere waren ungeeignet zur Operation, größere wurden nicht genommen, um zu starke Schwankungen der Einzelwerte zu vermeiden. Die Tiere waren vor Versuchsbeginn adlibitum mit Latzfutter und Wasser versorgt. Wegen der leichteren Harnblasenkatheterisierung mußten weibliche Tiere verwendet werden.

2. Versuchsanordnung: Während der ganzen Versuchsdauer lagen die Tiere in flacher Urethannarkose. Etwa eine Stunde vor Operationsbeginn wurden 0,8 g Urethan pro kg Körpergewicht injiziert, und zwar $\frac{2}{3}$ der Menge intraperitoneal und $\frac{1}{3}$ subcutan. In einzelnen Fällen mußte wegen verstärkter Unruhe der Tiere Urethan nachgespritzt werden, höchstens bis zum 1,5-fachen der sonst üblichen Menge. Eventuell dadurch bedingte Abweichungen der Ergebnisse wurden nicht beobachtet. Z.B. wird bezüglich der Gallesekretion von DEBRAY et al. (1964)[10] angegeben, daß diese unter Urethan konstanter sei als unter anderen Narkotika. In der gleichen Arbeit wird auch als ideales Körpergewicht für eine Ductus-choledochus-Drainage 300 g angegeben.

Zur Operation wurden die Tiere auf einem geheizten Operationstisch, der konstant auf 37°C gehalten wurde, in Rückenlage an den Extremitäten festgebunden. Durch einen Schnitt unterhalb des rechten Rippenbogens wurde das Abdomen eröffnet und vom Duodenum aus der Gallengang, der als weißlicher, zur Leber ziehender Strang leicht zu erkennen ist, aufgesucht. In diesen wurde ein schräg angeschnittener PVC-Katheter (Ø = 0,8 mm) durch einen schrägen Einschnitt in Richtung Leber eingeführt und mit einer vorbereiteten Ligatur so festgebunden, daß der gesamte Gallenfluß nach außen abgeleitet wurde. Anschließend wurden die Bauchdecken zugenäht.

Ein weiterer, vorher mit Wasser gefüllter PVC-Katheter (Ø = 0,8 mm) wurde durch die Urethra in die Harnblase eingeführt. Hierzu mußte die Urethraöffnung, die in einer Hauttasche verborgen liegt, mit einer Pinzette vorsichtig freigehalten werden. Verletzungen konnten dabei nicht immer vermieden werden. Es zeigte sich aber, daß geringe Blutbeimengungen im Harn die Ergebnisse nicht systematisch beeinflußten.

Nach beendeter Operation wurden die Substanzen, deren Ausscheidung geprüft werden sollte, injiziert. Vom Zeitpunkt der Injektion an wurden Galle und Harn über $4\frac{1}{2}$, bzw. 9, bzw. 2 mal $4\frac{1}{2}$ Stunden gesammelt. Im Folgenden wird die Zeit von der Injektion bis $4\frac{1}{2}$ Stunden post inj. Periode I, die Zeit von $4\frac{1}{2}$ bis 9 Stunden post inj. Periode II und entsprechend die Zeit von der Injektion bis 9 Stunden post inj. Periode I+II genannt.

Zu Beginn jeder $4\frac{1}{2}$ Stunden-Periode wurden zweimal im Abstand von 30 Minuten je 4 ml aqua dest. mit einer Magensonde zugeführt, um eine gesteigerte Diurese zu erreichen. Das war notwendig, um eine genügende Menge Harn für die Bestimmung von Sulfat und Glucuronid zu erhalten. Es zeigte sich, daß Streuungen der Einzelwerte von Glucuronid und Sulfat, selbst starke Abweichungen, nicht der produzierten Harn- oder Gallemenge parallel liefen. Bei sehr geringen Harnmengen (unter 0,5 ml/$4\frac{1}{2}$ Std.) wurde allerdings auf die Analyse verzichtet. Die Galleproduktion zeigte weniger starke Schwankungen und war immer ausreichend. Die Versuche wurden alle zur gleichen Tageszeit begonnen (zwischen acht und zehn Uhr vormittags), um eventuelle durch einen Tag-Nacht-Rhythmus bedingte Schwankungen auszuschließen.

3. Glucuronidbestimmung: Die Glucuronidmenge wurde nach der von DISCHE (1947)[11] angegebenen Methode bestimmt: Zu 1,0 ml mit aqua dest. verdünnter Galle bzw. verdünnten Harns, der im Methanolbad bei ca. -35°C bis zum Gefrieren vorgekühlt war, wurden vorher abgemessene 6,0 ml kurz vorgekühlte konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Die Verdünnungen wurden so gewahlt, daß Extinktionen von 0,200-0,700 zu erwarten waren (entsprechend etwa 15-45 Glucuronsäurelacton pro Ansatz); sie lagen zwischen 1:10 und 1:1000, je nach Substanz. Anschließend wurde nach vollständigem Auftauen der Mischung genau 20 Minuten im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Nach sofortiger Abkühlung auf Zimmertemperatur wurden je 0,2 ml einer 0,1%igen Carbazollösung in absolutem Äthanol zugefügt und zweimal sorgfältig umgeschüttelt. Von jeder Verdünnung wurden Doppelbestimmungen angesetzt, sowie ein Leerwert, dem kein Carbazol zugegeben wurde, um die immer auftretende Galleeigenextinktion und die nur manchmal vorhandene Harnextinktion zu bestimmen. Bei jeder Meßreihe wurde ein Testwert einer genau definierten Glucuronsäurelactonlösung, die 20 γ/ml enthielt, mit bestimmt. Die Doppelbestimmungen durften um höchstens 5 % von der Eichkurve abweichen. Andernfalls wurden die Werte verworfen.

Die Extinktion wurde im ZEISS-Photometer bei 525 nm in 20 mm-Küvetten gegen aqua dest. 2 Std. nach Carbazolzugabe gemessen. (Die Zeit von zwei Stunden wurde nie unterschritten, und um maximal 30 Minuten überschritten, da sich zeigte, daß bei längerem Warten die Extinktion im

Gegensatz zu den Angaben bei DISCHE zunahm, so daß sie nach $3\frac{1}{2}$ Stunden im Mittel um etwa 4 % höher lag als nach 2 Stunden). Die Galle- bzw. Harneigenextinktion wurde jeweils vom Mittelwert der doppelt bestimmten Gesamtextinktion abgezogen. Die Berechnung der Glucuronidmenge bezog sich auf eine Eichkurve aus 8 Meßreihen mit definierten Glucuronsäurelactonlösungen von 5 bis 60 pro Ansatz. Die Extinktion E = 0,100 entsprach danach 6,25 Glucuronsäurelacton. Alle angegebenen Werte sind auf Glucuronsäurelacton (Mol.Gew. 176,1) berechnet.

Reagentien: 1. konz. Schwefelsäure p.a.
2. Carbazolstammlösung 0,1 %ig in absolutem Äthanol
3. Glucuronsäurelacton-Stammlösung 0,1 %ig in aqua dest.

4. Sulfatbestimmung: In den selben Versuchen wurde parallel die Sulfatausscheidung von H. v. GREVE-DIERFELD[20] bestimmt.

5. Substanzen und Applikationsart: Zu den Versuchen dieser Arbeit wurden folgende Substanzen verwendet, von denen zu erwarten war, daß sie an Glucuronsäure oder an Glucuronsäure und Schwefelsäure gekoppelt ausgeschieden werden: 1. Chloralhydrat, 2. Phenol, 3. Natrium-Salizylat, 4. N-acetyl-p-aminophenol (NAPAP). In einer weiteren Versuchsreihe wurden zwei oder drei der genannten Pharmaka kombiniert verabreicht.

Die Substanzen wurden jeweils nach Beendigung der Operation (direkt zu Beginn der Periode I) subcutan injiziert, und zwar so konzentriert, daß immer die gleiche Menge an Lösung gespritzt wurde, nämlich je 0,5 ml in die rechte und linke Schenkelbeuge. Da die Lösung von NAPAP stark alkalisch ist, wurde bei hoher Dosierung nicht 1 ml, sondern 2 ml Lösung injiziert. Die Lösung wurde nicht gepuffert, da NAPAP dann eventuell ausgefallen wäre und dadurch die Resorption verzögert wäre.

Die Dosierung wird zwar in mg/kg Körpergewicht angegeben, es wurde aber insofern eine Vereinfachung vorgenommen, als für alle Tiere das mittlere Körpergewicht von 300 g angenommen wurde. Jede Substanz wurde in ansteigenden Dosierungen gegeben, bis etwa die toxische Grenze erreicht wurde. Chloralhydrat wurde in Dosen von 20 mg/kg (= 6 mg pro Tier), 50 (15), 100 (30), 200 (60), 300 (90) und 400 (120) mg/kg (mg/Tier) gegeben. Bei 600 mg/kg (180 mg/Tier) überlebten die Tiere nicht. Nur in

einem Fall konnte die Bestimmung durchgeführt werden. Schon bei 400 mg/kg starben von 20 Tieren 7, bei 300 mg/kg von 16 Tieren eins.

Phenol wurde wie folgt dosiert: 20, 50, 100, 150 mg/kg. Bei höheren Dosen traten Krämpfe auf.

Die weiteren Dosierungen sind dem Abschnitt über die Versuchsergebnisse und den Tabellen zu entnehmen.

6. Statistische Auswertung: Pro Versuch wurden in der Regel nicht weniger als 6 Tiere verwertet. Die statistische Berechnung folgte der t-Verteilung nach STUDENT (FREUDENBERG, K. 1962[16]; Documenta GEIGY 1955[12]).

Folgende Berechnungen wurden angewendet:
Mittelwert M der Einzelwerte x

$$M = \frac{\Sigma x}{n},$$

wobei n die Zahl der Einzelwerte darstellt.
Mittlere quadratische Abweichung der Einzelwerte

$$s_x = \sqrt{\frac{\Sigma (x-M)^2}{(n-1)}}$$

Mittlerer Fehler des Mittelwertes

$$s_M = \frac{s_x}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\Sigma (x-M)^2}{n\,(n-1)}}$$

Die Wahrscheinlichkeit P, daß die Differenz zweier Mittelwerte M_1 und M_2 zufällig ist, wurde aus Tabellen für die t-Verteilung abgelesen. Dabei ist

$$t = \frac{M_1 - M_2}{s_D}.$$

s_D, die Standardabweichung der Mittelwertdifferenz wird berechnet als

$$s_D = s_{x_1, x_2} \sqrt{\frac{n_1+n_2}{n_1 n_2}}$$

und s_{x_1,x_2} als

$$s_{x_1,x_2} = \sqrt{\frac{s_{x_1}^2 (n_1-1) + s_{x_2}^2 (n_2-1)}{n_1+n_2-2}} .$$

Auf diese Weise wurde jeder Mittelwert mit dem bei nächst niederer Dosierung der entsprechenden Substanz verglichen.

Folgende Stufen der Signifikanz wurden angenommen:

bei $P \leq 0{,}01$ sicher signifikant (+++ und ++)

bei $P \leq 0{,}02$ signifikant (+)

bei $P > 0{,}02$ nicht sicher signifikant (-).

III. Ergebnisse (Tabellen, die nicht in den Text aufgenommen sind, finden sich im Anhang)

1. Kontrolltiere (Tab 1): Die, abgesehen von Narkose und Operation, unbehandelten Tiere schieden in der Periode I mit dem Urin im Mittel 2,01 mg Glucuronsäure (berechnet als Lacton), mit der Galle 0,91 mg aus. In Periode II wurden im Urin 1,19 mg und in der Galle 0,65 mg gefunden. Die Basisausscheidung ist also im Urin etwa doppelt so groß wie in der Galle. Während der Gesamtversuchszeit von 9 Stunden (Periode I+II) nimmt sie signifikant ab ($P < 0{,}001$). Wegen dieser Abnahme der Basisausscheidung wurde darauf verzichtet, diese für jedes Tier individuell in einer Vorperiode zu bestimmen, und stattdessen die angegebenen Mittelwerte für alle Tiere zugrunde gelegt.

Die Sulfatausscheidung ist in der Galle vernachlässigbar gering. Im Harn wurde in Periode I 1,50 mg ($s_M = 0{,}15$, $n = 21$) Estersulfat und in Periode II 0,71 mg ($s_M = 0{,}05$, $n = 9$) ausgeschieden. (v. GREVE-DIERFELD).

2. Chloralhydrat (Tab 2, Abb. 1) (Mol.Gew. 164; 1 mg Glucuronsäurelacton ≙ 0,93 mg Chloralhydrat): Bis zur Dosis 200 mg/kg (60 mg/Tier) stieg die Glucuronidausscheidung im Harn mit steigender Dosis signifikant an ($P < 0{,}001$) und zwar annähernd im gleichen Verhältnis wie die Dosis. Die prozentuale Ausscheidung des Chloralhydrat als glucuroni-

dierte Verbindung, d.h. glucuronidiertes Trichloraethanol (SMITH and WILLIAMS 1954[35], blieb konstant und betrug etwa 71 % der verabreichten Dosis. (Berechnung:

$$\frac{0{,}93 \times (\text{mg Glucurons.gesamt} - \text{mg Basisglucur.}) \times 100}{\text{mg injiz. Chloralhydrat}} = \%)$$

Nur bei der kleinsten Dosis (20 mg/kg) war die prozentuale Ausscheidung niedriger. Dabei ist aber zu bedenken, daß bei diesem niedrigen Wert eine Streuung der Basisglucuronidausscheidung viel stärker ins Gewicht fällt. Eine entsprechende Bemerkung über die Phenolausscheidung bei niedriger Dosierung findet sich bei PORTEOUS und WILLIAMS (1949)[31].

In der Galle konnte bei 20 mg/kg noch kein signifikanter Anstieg der Glucuronidbildung festgestellt werden, dagegen ein deutlich signifikanter Anstieg bei 50 und 100 mg/kg ($P < 0{,}001$). Die weitere Steigerung bei Erhöhung der Dosis auf 200 mg/kg konnte statistisch nicht gesichert werden.

Bei höheren Dosen (300 und 400 mg/kg, bzw. 90 und 120 mg pro Tier) zeigten sich in der Galle und Urin entweder Abfall oder geringfügige weitere Steigerungen der Glucuronidmenge, beides aber ohne Signifikanz. Auch wenn einzelne extrem niedrige Glucuronidwerte im Harn ausgeschlossen wurden, da sie eventuell auf einer toxischen Schädigung des Bildungs- oder Ausscheidungsmechanismusses beruhen könnten, konnte keine statistisch gesicherte Steigerung errechnet werden (Tab 2).

Das offenbar bei einer Dosis von 200 mg/kg erreichte Maximum der Glucuronidausscheidung im Urin in $4\frac{1}{2}$ Stunden liegt etwa zwischen 40 und 50 mg. Einzelwerte lagen aber wesentlich höher. Der höchste Einzelwert, bei einer Dosis von 400 mg/kg, betrug 90,5 mg Glucuronsäure im $4\frac{1}{2}$ Stunden-Harn, entsprechend einer relativen Ausscheidung von 68,6 %. In Galle und Harn zusammen liegt das Maximum etwa zwischen 42 und 56 mg/$4\frac{1}{2}$ Stunden.

Ob die Erreichung eines Maximums auf eine echte Auslastung des glucuronidierenden Systems schließen läßt oder auf einem toxischen Effekt des Chloralhydrat beruht, ist zu diskutieren.

Die Ausscheidung des Chloralhydrat scheint bis zur Dosis 200 mg/kg innerhalb $4\frac{1}{2}$ Stunden annähernd vollständig zu sein, da weder in Galle noch Harn innerhalb 9 Stunden eine höhere Glucuronidmenge beobachtet werden konnte. Bei 300 mg/kg ist sie auch nach $4\frac{1}{2}$ Stunden noch erhöht, also in Periode II (3 Einzelversuche; Tab 2a). Bei einem Tier war auch bei 200 mg/kg die Glucuronidmenge in der Periode II stark erhöht, dafür aber in der ersten Periode extrem niedrig, so daß an eine verzögerte Resorption gedacht werden könnte (Tier Nr. 417; Tab 2a). Das Gleiche gilt für das Tier Nr. 412 (Tab 2a).

Tabelle 2a

	Dosis	300 mg/kg			200 mg/kg
	Tier Nr.	412	414	415	417
Galle	Periode I	14,16	11,70	-	-
	II	6,48	2,20	-	-
	I+II	20,64	13,90	-	-
Harn	Periode I	19,17	45,44	53,53	17,69
	II	36,94	21,48	24,69	27,37
	I+II	56,11	66,92	78,20	45,06

Interessant ist, daß in vier Einzelfällen, in denen die Glucuronidmenge im Harn extrem niedrig lag, sie in der Galle weit über dem Mittelwert lag (Nr. 210, 211, 264, 352; Tab 2b):

Tabelle 2 b

	400 mg/kg	Periode I	200 mg/kg	Periode I+II
	Galle	Harn	Galle	Harn
Mittelwert	7,95	44,49	6,75	40,89
s_M	1,50	2,92	1,2	5,0
210	14,92	9,76	-	-
Einzel- 211	21,36	5,32	-	-
werte 264	10,58	27,98	-	-
352	-	-	13,04	17,16

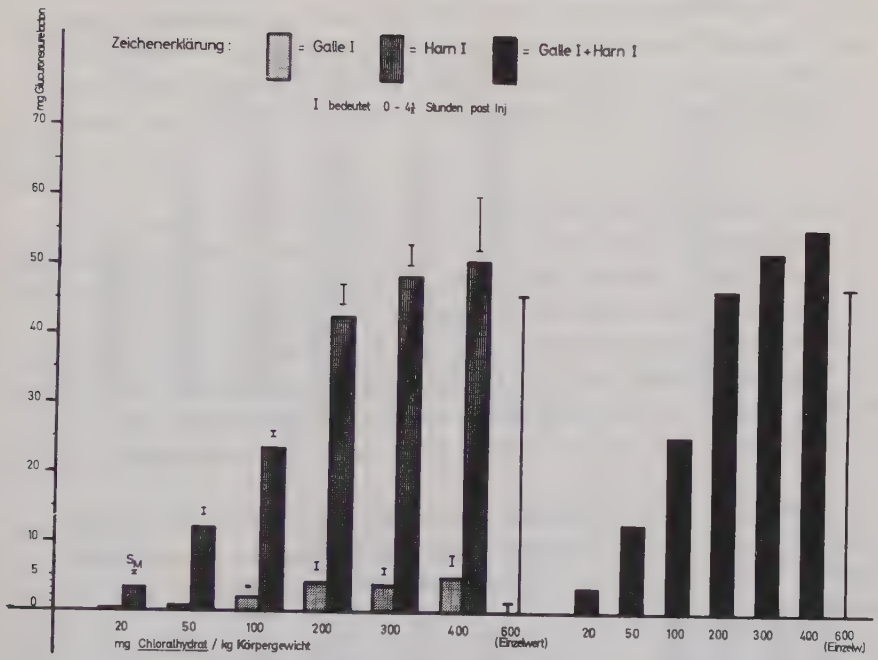

Abb. 1 zeigt die Glucuronidausscheidung in Galle und Harn nach s.c.-Injektion von Chloralhydrat. Man sieht eine deutliche Dosisabhängigkeit bis zur Dosis 200 mg/kg. Der weitere Anstieg bei höherer Dosierung ist nur gering und nicht signifikant. (Die Größe von s_M ist dargestellt).

Bei zwei nebeneinanderstehenden Säulen repräsentiert jeweils die linke die Ausscheidung mit der Galle, die rechte die mit dem Harn. Im rechten Teil der Abb. ist die Gesamtausscheidung in Galle + Harn dargestellt. Alle Glucuronidwerte sind abzüglich Normalwert zu verstehen.

Eine Bindung des Chloralhydrat oder dessen Metaboliten an Schwefelsäure findet nur in geringem Maße statt. (v. GREVE-DIERFELD). Nach 100 mg Chloralhydrat pro kg fanden sich im Harn 1,79 mg Estersulfat (s_M = 0,27) bei einem Normalwert von 0,74 mg (s_M = 0,05). Dieser Wert ist signifikant höher ($P < 0{,}002$). Nach 400 mg/kg fanden sich 2,06 mg (s_M = 0,31). Diese weitere Erhöhung ist statistisch nicht gesichert ($P > 0{,}04$).

3. Phenol (Tab 3 und 3a; Abb. 2) (Mol.Gew. 94; 1 mg Glucurons.lakton $\hat{=}$ 0,53 mg Phenol; 1 mg Sulfat $\hat{=}$ 0,96 mg Phenol): Die Glucuronidausscheidung in $4\frac{1}{2}$ Stunden nahm in Galle und Harn mit steigender Dosis signifikant zu, und zwar in der Galle annähernd linear (außer dem Wert bei 50 mg/kg, der aus unbekannten Gründen aus der Reihe fiel), im Harn zunächst verhältnismäßig mehr als der Dosiserhöhung entsprach, dann auch annähernd linear. Ein Maximum konnte nicht beobachtet werden. Der höchste Einzelwert (Tier Nr. 239) betrug 57,35 mg im $4\frac{1}{2}$ -Stundenurin.

In 9 Stunden lag die Ausscheidung zwar etwas höher als in $4\frac{1}{2}$ Stunden (nach 100 mg Phenol/kg), aber ohne Signifikanz, so daß man auch beim Phenol mit einer nahezu vollständigen Ausscheidung innerhalb $4\frac{1}{2}$ Stunden rechnen kann.

Während die Glucuronidausscheidung zunächst stärker ansteigt, als der Dosiserhöhung entspricht, verhält sich die Sulfatbildung (v. GREVE-DIERFELD) entgegengesetzt (Tab. 3a). Die Ausscheidung von Estersulfat mit der Galle zeigte sich in Vorversuchen vernachläßigbar niedrig. Sie wurde deshalb nur im Harn bestimmt. Sie nimmt relativ mit steigender Dosis ab, absolut nimmt sie bis zur Dosis 100 mg/kg zu, wo sie offenbar maximal ausgelastet ist (11,2 mg Sulfat im $4\frac{1}{2}$ -Stundenurin).

Die relative Ausscheidung des Phenol als Sulfat und Glucuronid zusammen sinkt mit steigender Dosis (Tab. 3a). Die Glucuronidierung kann also die frühzeitige Erschöpfung der Sulfatbindung nur teilweise kompensieren.

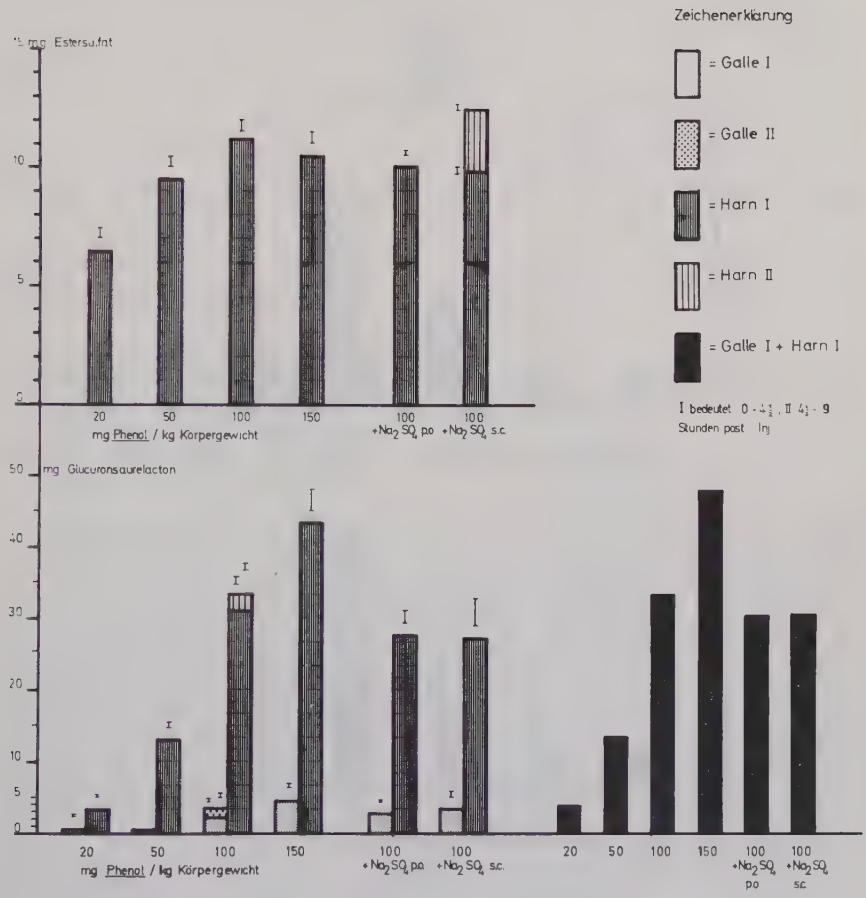

Abb. 2: Sulfatausscheidung im Harn (oben) und Glucuronidausscheidung in Galle und Harn (unten) nach s.c.-Injektion von Phenol (vgl. auch Abb. 7). Die Sulfatausscheidung erreicht bis 100 mg Phenol/kg ihr Maximum. Kein Maximum der Glucuronidausscheidung. Gleichzeitige Gabe von Na_2SO_4 p.o. oder s.c. ändert weder die Sulfat- noch die Glucuronidbildung. Im unteren Teil der Abb. links Ausscheidung von Glucuronid in Galle und Harn getrennt dargestellt, rechts als Gesamtausscheidung. Sulfat und Glucuronidmengen abzüglich Normalwert.

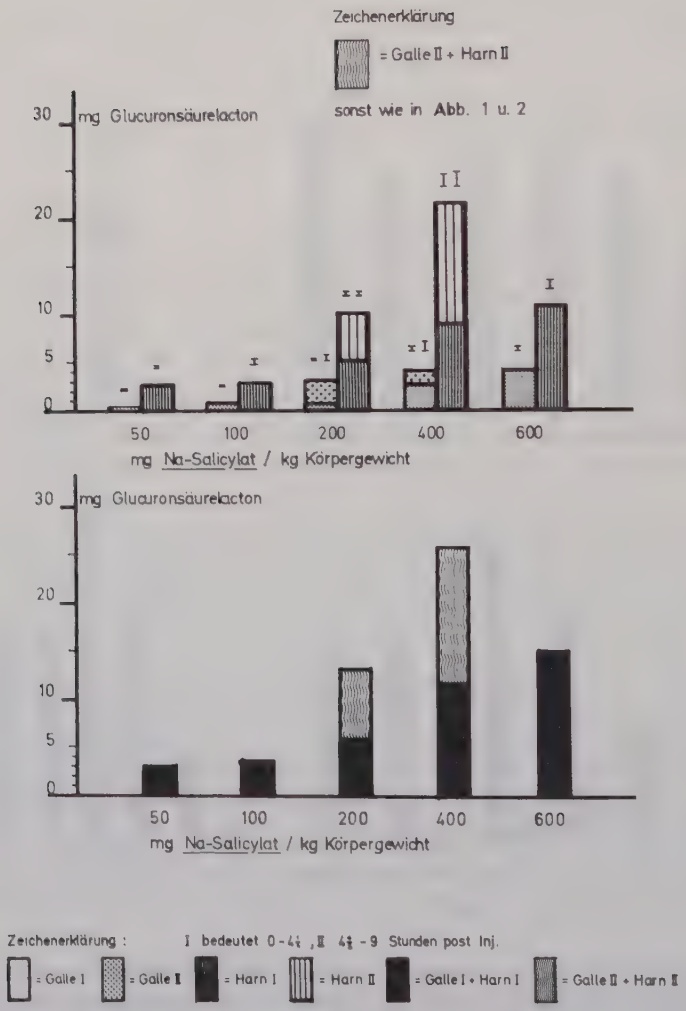

Abb. 3: Glucuronidausscheidung in Galle und Harn nach s.c. Injektion von Na-Salicylat. Geringe dosisabhängige Steigerung der Ausscheidung ohne Erreichen eines Maximum. In 9 Stunden wird ca. doppelt so viel ausgeschieden wie in $4\frac{1}{2}$ Stunden.
Oben ist die Ausscheidung in Galle (linke Säulen) und Harn (rechte Säulen) getrennt dargestellt, unten die Gesamtausscheidung. Alle Werte

Bei gleichzeitiger Gabe von Natrium-Sulfat per oral oder subcutan (0,05 n Na_2SO_4 8 ml/Tier p.o. + 1 ml s.c.; bzw. in einem anderen Versuch 42 mg Na_2SO_4 s.c.) zu 100 mg Phenol pro kg liegt die Glucuronidmenge im $4\frac{1}{2}$ Stundenharn zwar etwas niedriger als ohne Sulfat, aber ohne Signifikanz. Auch die Sulfatausscheidung bleibt praktisch unbeeinflußt.

Auch in diesem Versuch lag bei einem Tier die Glucuronidmenge im Harn extrem niedrig, dafür in der Galle weit über dem Durchschnitt (Tab 3b):

Tabelle 3b

Phenol 100 mg/kg Periode I

	Galle	Harn
Mittelwert	4,35	29,37
s_M	0,85	3,7
Tier Nr. 324	7,80	10,28

4. Natriumsalizylat (Tab 4; Abb. 3) (Mol.Gew. 160; 1 mg Gluc.s.lacton ≙ 0,91 mg Salizylat): Na-Salizylat wurde in folgenden Dosierungen verabreicht: 50; 100; 200; 400; 600 mg/kg (15; 30; 60; 120; 180 mg/Tier). Die Glucuronidmenge in $4\frac{1}{2}$ Stunden-Galle und -Harn liegt wesentlich niedriger als bei entsprechenden Dosen Chloralhydrat oder Phenol. Absolut findet man eine Erhöhung mit steigender Dosis, die aber kaum statistisch zu sichern ist. Relativ nimmt die Ausscheidung des Salizylates als glucuronidierte Verbindung ab. Bei der Berechnung wurde davon ausgegangen, daß nur Monoglucuronide (KAPP and COBURN 1942[21]) ausgeschieden werden, so daß 1 mg Glucuronsäurelacton 0,91 mg Na-Salizylat entspricht. Bei Annahme von doppelt glucuronidiertem Salizylat würde die prozentuale Ausscheidung natürlich noch niedriger liegen.

In 9 Stunden wird bei Dosen von 200 und 400 mg/kg etwa doppelt so viel Glucuronsäure ausgeschieden wie in $4\frac{1}{2}$ Stunden. Ob eine langsamere Resorption oder eine langsamere Bindung an Glucuronsäure als bei Chloralhydrat und Phenol vorliegt, ist zu diskutieren.

---

abzüglich Normalwert. Bei geteilten Säulen gibt der untere Teil die Ausscheidung in Periode I (0-$4\frac{1}{2}$ Std. p.Inj.), der obere die in Periode II ($4\frac{1}{2}$ Std.p.Inj.) wieder.

Die Ausscheidung von Estersulfat (v. GREVE-DIERFELD) im Urin ist nach Belastung mit Na-Salizylat geringfügig erhöht (Tab 4a). Diese Erhöhung ist nicht dosisabhängig, aber gegenüber dem Normalwert signifikant. In 9 Stunden ist sie nicht höher als in $4\frac{1}{2}$ Stunden.

5. N-acetyl-p-aminophenol (NAPAP) (Tab 5; Abb. 4) (Mol.Gew. 151; 1 mg Gluc.s.lact. $\hat{=}$ 0,86 mg NAPAP; 1 mg Sulfat $\hat{=}$ 1,54 mg NAPAP): NAPAP wurde in den Dosierungen 100; 200; 400; 600 mg/kg (30; 60; 120; 180 mg/Tier) injiziert. Bei allen Tieren wurde Glucuronsäure und Sulfat in Periode I und Periode II bestimmt. Die Glucuronidbildung durch NAPAP unterscheidet sich in drei Punkten von der durch Chloralhydrat, Phenol und Salizylat.
1. liegt die Glucuronidmenge in der Galle erheblich höher als in den anderen Versuchen, bei hoher Dosierung in Periode I sogar über der gleichzeitig im Harn ausgeschiedenen Menge. 2. ist die im Harn ausgeschiedene Menge in Periode II bei hoher Dosis (400 und 600 mg/kg) größer als in Periode I. 3. besteht eine verschiedene Dosisabhängigkeit der Glucuronidausscheidung in Galle und Harn.

In der Galle steigt die Ausscheidung in Periode I und Periode II in einem größeren Verhältnis als der Dosiserhöhung entspricht, d.h. die prozentuale Ausscheidung des NAPAP als glucuronidierte Verbindung nimmt mit steigender Dosis zu. Dieser Effekt ist in der zweiten Periode wesentlich ausgeprägter, so daß bei einer Dosis von 600 mg/kg die Glucuronidmenge in beiden Perioden annähernd gleich ist, während sie bei 100 mg/kg in der Periode I etwa drei mal so hoch ist wie in der Periode II.

Im Harn nimmt die Glucuronidmenge in Periode I nur bis zur Dosis 400 mg/kg zu, wobei der Unterschied des Wertes bei 400 mg/kg zu dem bei 200 mg/kg schon nicht mehr signifikant ist ($P = 0,3$). Relativ nimmt die Glucuronidbildung von der Dosis 200 mg/kg an ab. In der zweiten Periode nimmt dagegen die Glucuronidmenge absolut und relativ mit steigender Dosis signifikant zu. Bei niedriger Dosis ist die Ausscheidung in beiden Perioden etwa gleich, bei hoher Dosierung in der zweiten Periode stärker.

Dafür, daß eine Sättigung der Glucuronidbildung erreicht würde, ist kein Anhalt gegeben. Der höchste Einzelwert (Tier Nr. 501; 600 mg NAPAP/kg) beträgt 46,01 mg im $4\frac{1}{2}$ -Stundenharn (Periode II) und 27,83 mg in der $4\frac{1}{2}$ -Stundengalle (Periode II) beim gleichen Tier.

Als Phenolderivat wird NAPAP auch als Sulfatester ausgeschieden. Wie beim Phenol wird eine Sättigung der Sulfatveresterung erreicht, die 10 mg/ $4\frac{1}{2}$ Stunden nicht überschreitet (v. GREVE-DIERFELD) (Tab 5a; Abb. 4).

6. Kombination der einzelnen Substanzen (Tab 6, Abb. 5)

Folgende Kombinationen wurden subcutan injiziert:

a) Chloralhydrat 200 mg/kg + Phenol 100 mg/kg
b) Chloralhydrat 200 mg/kg + Na-Salizylat 400 mg/kg
c) Na-Salizylat 200 mg/kg + Phenol 100 mg/kg
d) Chloralhydrat 200 mg/kg + Phenol 100 mg/kg + Na-Salizylat 200 mg/kg.

Es sollte mit diesen Kombinationen versucht werden, die Glucuronidbindung stärker zu belasten, ohne in die toxischen Bereiche der einzelnen Substanzen zu gelangen. Auch hier wurde bei allen Tieren die Ausscheidung in Periode I und Periode II gemessen. Die ausgeschiedenen Mengen Glucuronid und Estersulfat (abzüglich Normalwert) wurden verglichen mit den Werten, die sich durch Addition der Mengen, die nach Belastung mit nur einer Substanz in der entsprechenden Dosierung ausgeschieden wurden (ebenfalls abzüglich Normalwerten), berechnen ließen. Dabei zeigte sich, daß die additiven Werte für Glucuronid in der Galle bei allen Kombinationsversuchen in Periode I übertroffen wurden, zum Teil ganz erheblich. So betrug die Glucuronidausscheidung in Versuch 6c 371,7 % des errechneten Wertes. In 9 Stunden (Periode I + II) lagen die gemessenen Werte ebenfalls höher als die errechneten, aber nicht in dem Maße wie in Periode I.

Im Harn wurden die für Periode I errechneten Werte in keinem Fall erreicht. Auch nicht in Versuch 6c: Es wurden 29,8 mg Glucuronid in $4\frac{1}{2}$ Stunden gewonnen (Normalwert abgezogen) bei einem erwarteten Wert von 56,5 mg/$4\frac{1}{2}$ Stunden, der noch unter dem zwischen 40 und 50 mg/$4\frac{1}{2}$ Stunden

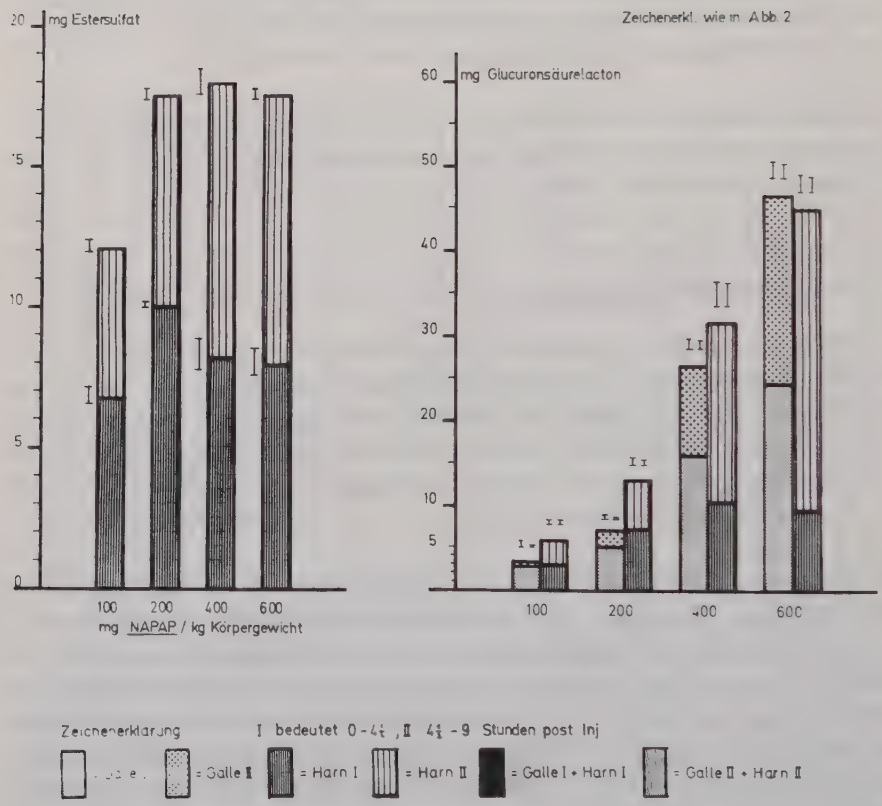

Abb. 4: Sulfatausscheidung im Harn (links) und Glucuronidausscheidung (rechts) in Galle (jeweils linke Säule) und Harn (rechte Säule) nach s.c. Injektion von NAPAP. Die Sulfatausscheidung ist nicht dosisabhängig. Die Glucuronidbildung nimmt deutlich mit der Dosis zu (vgl. auch Abb. 8).
Der untere Teil der Säulen gibt die Ausscheidung in Periode I (0 - $4\frac{1}{2}$ Std. p. Inj.), der obere in Periode II ($4\frac{1}{2}$ - 9 Std. p. Inj.) wieder.

vermuteten Maximum (s. Versuch 2) liegt. In den Versuchen 6a, b und d lagen die Erwartungswerte für Periode I über 50 mg/$4\frac{1}{2}$ Stunden. In 9 Stunden wurde der erwartete Wert in Versuch 6a und 6c erreicht, in Versuch 6b und 6d nicht. In letzterem lag der gemessene 9-Stunden-Wert sogar unter dem errechneten $4\frac{1}{2}$ Stunden-Wert, der allerdings mit 78,8 mg/$4\frac{1}{2}$ Stunden der höchste dieser Art war und fast dem Maximum für 9 Stunden entsprach.

Die Gesamtausscheidung von Glucuronid (Galle + Harn) erreichte den errechneten Wert um so weniger, je höher dieser lag, (Periode I), bzw. lag um so weniger über dem errechneten Wert, je höher dieser war (Periode I+II). Dazu die folgende Tabelle 6b (vgl. Tab. 6 und 6a und Abb. 5):

Versuch und Periode	% des erwarteten Wertes Galle	Harn	G.+H.	erwarteter Wert G.+H.
6c I	371,7	82,0	104,9	39,24 mg
I+II	196,9	99,9	112,8	50,32
6b I	152,3	84,1	92,3	58,44
I+II	154,8	87,9	96,5	73,40
6a I	126,9	80,4	84,3	80,11
I+II	104,1	105,2	105,1	84,72
6d I	213,7	60,3	73,2	86,01
I+II	166,6	87,4	97,1	97,96

Die Produktion von Galle-Glucuronid scheint einen Mangel der Harn-Glucuronidbildung wenigstens teilweise zu kompensieren.

Die Sulfatbildung (v. GREVE-DIERFELD), die ja nur bei Kombinationen mit Phenol von Interesse ist, liegt in Versuch 6a erwartungsgemäß bei 10,5 mg Estersulfat/$4\frac{1}{2}$ Stunden. Wurde gleichzeitig Na-Salizylat verabreicht (6c und d), so blieb die erwartete Sulfatausscheidung aus. Gerade in diesen beiden Versuchen ist aber die Glucuronidbildung in der Galle stark überschießend.

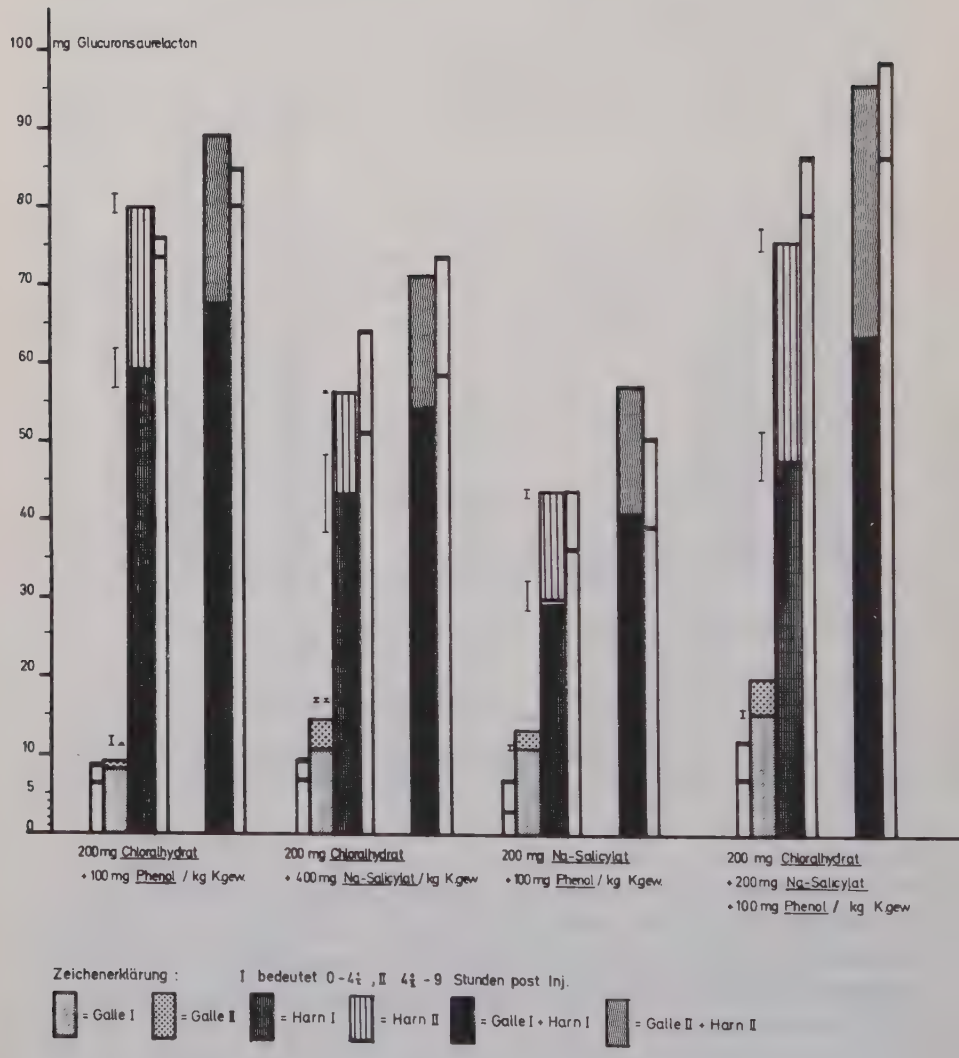

Abb. 5: Glucuronidausscheidung in Galle und Harn nach s.c. Inj. von zwei, bzw. drei Substanzen gleichzeitig. Die gemessenen Mengen (schraffierte Säulen) werden mit den errechneten Erwartungswerten (leere,

IV. Diskussion.

Es ging bei dieser Arbeit um die Frage, wie weit zwei der wichtigsten Ausscheidungsmechanismen für fremde Substanzen und körpereigene Stoffwechselprodukte, die Konjugation mit Glucuronsäure und Schwefelsäure, belastbar sind. Wie weit ist die Menge der gebildeten Konjugate von der Menge der auszuscheidenden Substanz abhängig, bzw. wann wird sie durch den endogenen Stoffwechsel limitiert?

Zur experimentellen Beantwortung dieser Frage in vivo eignen sich am besten solche Substanzen, die möglichst schnell konjugiert werden, damit die Belastung der konjugierenden Systeme pro Zeiteinheit möglichst groß ist, und zweitens eine geringe Toxizität besitzen, um eine toxische Schädigung dieser Systeme weitgehend auszuschließen. Beide Forderungen konnten nur unbefriedigend erfullt werden.

Die Geschwindigkeit der entgiftenden Bindung ist von mehreren Faktoren abhängig:

Erstens ist es eine Frage der Resorptionsgeschwindigkeit, oder allgemeiner ausgedrückt, der Permeationsfähigkeit der Substanz durch biologische Membranen, also vom Applikationsort (hier das Subcutangewebe) in die Blutbahn, von dort in die Zellen, in denen die Bildung der ausscheidungsfähigen Metaboliten vonstatten geht und schließlich innerhalb der Zellen zu den verantwortlichen Zellorganen, also im Falle der Glucuronidierung in die Mikrosomen, dem Wirkort der Glucuronyltransferase (STOREY and DUTTON 1955[39]; DUTTON and STOREY 1954[15]). In dieser Beziehung scheinen Chloralhydrat und Phenol günstige Substanzen zu sein. Beide sind aufgrund ihrer chemischen Struktur gut wasser- und fettlöslich, wodurch eine relativ rasche Verteilung im Organismus

---

halbbreite Säulen) verglichen. Der untere Teil der Säulen bedeutet jeweils die Ausscheidung in Periode I (0 - $4\frac{1}{2}$ Std. p. Inj.), der obere in Periode II ($4\frac{1}{2}$ - 9 Std. p. Inj.)
Die Ausscheidung mit der Galle übertrifft den Erwartungswert in allen Fällen, die im Harn in Periode I nie, in Periode I+II nur im 1. und 3. Versuch. Die Ausscheidung in Galle und Harn in 9 Stunden erreicht annähernd die Erwartungswerte.

garantiert ist. Es zeigte sich in diesen Versuchen auch, daß beide Verbindungen bereits nach $4\frac{1}{2}$ Stunden praktisch vollständig eliminiert waren. Unsicherer ist die Resorption von Na-Salicylat. Da es als Ion gegeben wird, ist die Resorption pH-abhängig, und es muß erst die undissoziierte Säure gebildet werden, bevor überhaupt eine Membranpermeabilität gewährleistet ist. Allerdings soll Salizylat im allgemeinen sehnell resorbiert und verteilt werden. Beim Menschen ist es im Plasma zu 50-80 % an nicht diffusible Komponenten (Protein) gebunden, so daß auch damit die langsame Ausscheidung erklärt werden kann (GOODMAN and GILMAN 1958(17)). Beim Menschen werden in 24 Stunden 50 % des Salizylates (bei therapeutischen Dosen) ausgeschieden (ALPEN et al. 1951(1)). Bei den Versuchen dieser Arbeit wurden bereits nach 9 Stunden 20 % als Glucuronid ausgeschieden. Eine solche Bindung an Proteine wäre ein zweiter Faktor zur Beeinflussung der Ausscheidungsgeschwindigkeit.

Über die Schwierigkeiten der NAPAP-Löslichkeit wurde bereits auf S. 4 hingewiesen. Daß die Ausscheidung des Salizylat in der Periode II in gleicher Menge wie in Periode I vor sich geht, die des NAPAP sogar stärker als in Periode I, ist möglicherweise eine Folge einer Depotwirkung durch Resorptionsverzögerung oder Bindung an Plasmaproteine. Die Zunahme der NAPAP-Ausscheidung während der Versuchsdauer trifft übrigens nicht für den Sulfatester zu, da in beiden Perioden bereits der Grenzwert dieses Ausscheidungsmechanismus erreicht ist (Tab 5a und Abb. 4).

Drittens ist die Ausscheidungsgeschwindigkeit davon abhängig, ob die applizierte Substanz selbst oder erst einer ihrer Metaboliten konjugiert wird und, wenn letzteres der Fall ist, wie schnell dieser Metabolit gebildet wird. So wird Chloralhydrat nicht direkt an Glucuronid gebunden, sondern erst nach Umwandlung in Trichloräthanol (BUTLER 1949 (8); SMITH and WILLIAMS 1954(35)). Phenol wird sowohl an Glucuronsäure als auch an Schwefelsäure ohne vorherige Umwandlung direkt gebunden (PARKE and WILLIAMS 1953(29)). Das Gleiche gilt vermutlich für NAPAP, das ein Phenolabkömmling ist. Zum Teil wird es allerdings vor oder nach der Konjugation deacetyliert, da sowohl konjugiertes NAPAP als auch konjugiertes p-Aminophenol ausgeschieden werden (BRODIE and AXELROD 1948(7)).

Bei der Salizylsäure stellt sich die Frage, ob sie an der Carboxyl- oder Hydroxylgruppe mit Glucuronsäure gekoppelt wird, ob sich also Ester- oder Ätherglucuronid bildet, oder ob eine Glucuronidierung beider Gruppen stattfindet, so daß ein Molekül Salizylsäure zwei Moleküle Glucuronsäure binden würde. Beim Menschen erscheinen 20 - 25 % des im Urin ausgeschiedenen Salizylates als Glucuronid. Dabei stehen Glucuronsäure und Salizylsäure etwa im äquimolaren Verhältnis zueinander (KAPP and COBURN 1942[21]), es werden also keine Diglucuronide gebildet. Nach ALPEN et al. (1951)[1] und nach ROBINSON and WILLIAMS (1956)[33] werden vom Menschen zwei Monoglucuronide ausgeschieden: 1. ein Ester: o-Hydroxybenoylglucuronid und 2. ein Äther: o-Carboxylphenylglucuronid. Beim Hund wird nur das Ätherglucuronid gefunden. Beim Kaninchen wurden 3-4 % des ausgeschiedenen Salizylates als Esterglucuronid und 5-14 % als Ätherglucuronid gefunden, aber kein Sulfat (BRAY et al. 1948[6]).

Ein vierter Faktor, von dem eine Begrenzung der Ausscheidungsgeschwindigkeit abhängt, ist die Aktivität der die Glucuronsäure, bzw. die Schwefelsäure übertragenden Enzyme, also der Glucuronyltransferase und Sulfokinase, und die Affinität der auszuscheidenden Substanz zu diesen Enzymen. Wahrscheinlich gibt es nur eine unspezifische Glucuronyltransferase, die die Übertragung auf die verschiedensten Gruppen besorgt (DUTTON 1961[14]). Von DUTTON werden folgende Gruppen angegeben, auf die Glucuronsäure übertragen werden kann: 1. OH-Gruppen in Phenolen und prim., sek. oder tert. Alkoholen, 2. Carboxylgruppen in aromatischen und bestimmten aliphatischen Verbindungen, 3. NH-Gruppen aliphatischer oder aromatischer Aminoverbindungen, 4. SH-Gruppen bestimmter Schwefelverbindungen wie Thiophenol und Mercaptobenzothiazole. Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen gehören also zur 1., bzw. Salizylat zur 1. und 2. Gruppe. Die Unterschiede in der Konjugationsrate verschiedener Stoffe müssen durch Kompetition und verschiedene Eintrittsraten in die Mikrosomen erklärt werden (DUTTON[14]). ISSELBACHER et al. (1962)[20a] vermuten zwei verschiedene Glucuronyltransferasen, eine für die Bildung von Ester- und Ätherglucuroniden, eine zweite für die Bildung von N-Glucuroniden.

Für die Schwefelsäureübertragung von Phosphoadeninphosphosulfat (PAPS) gibt es verschiedene Sulfokinasen (GREGORY 1961[18]; GREGORY and LIPMAN

1957[19]), dabei soll die Übertragung auf reines Phenol quantitativ in Richtung des Phenolsulfates vor sich gehen.

Während alle anderen genannten Faktoren von Eigenschaften der applizierten Substanzen abhängen, ist die Aktivität der übertragenden Enzyme eine Eigenschaft des Organismus. Ein weiterer nur dem Organismus zugehöriger Faktor ist die Menge an übertragbarer Glucuronsäure, bzw. Schwefelsäure, die pro Zeiteinheit zur Verfügung steht. Die Glucuronsäure wird in Form der Uridin-diphospho (UDP)-Glucuronsäure, die über UDP-Glucose aus Glucose-6-Phosphat mit Hilfe der Uridyltransferase und der UDP-Glucose-Dehydrogenase entsteht, bereitgestellt. Die UDP-Glucuronsäure ist außerdem ein Zwischenprodukt der Mucopolysaccharidensynthese (s.z.B. BECK und RICHTER 1962[3]; MILLS et al. 1958[27]). Das anorganische Sulfat wird in Form des PAPS zur Verfügung gestellt.

Solange die Ausscheidungsgeschwindigkeit von Eigenschaften der auszuscheidenden Substanz bestimmt wird, oder allgemein ausgedrückt von der Affinität der Substanz zu dem entsprechenden Ausscheidungsmechanismus (damit ist gleichzeitig die an sich selbstverständliche Wechselwirkung zwischen Pharmakon und Stoffwechsel zum Ausdruck gebracht), solange ist zu erwarten, daß die Abhängigkeit der ausgeschiedenen Konjugatmenge pro Zeit von der applizierten Dosis etwa linear verläuft, wobei die Steilheit einer solchen Geraden diese Affinität repräsentiert. In einem solchen Falle wäre also, unabhängig von der Dosis, der Prozentsatz, der als das entsprechende Konjugat pro Zeit ausgeschieden wird, immer der gleiche - die relative Ausscheidung z.B. als Glucuronid wäre konstant. Abb. 6 zeigt deutlich die verschiedenen Affinitäten der einzelnen Verbindungen zum glucuronidierenden System. Um die Kurven miteinander vergleichen zu können, wurden die Dosen in äquimolaren Verhältnis aufgetragen und als mMol/kg angegeben. Es zeigt sich, daß Chloralhydrat der beste Glucuronidbildner von den verwendeten Verbindungen ist. Es folgt Phenol, dann NAPAP und schließlich als schlechter Glucuronidbildner Na-Salizylat.

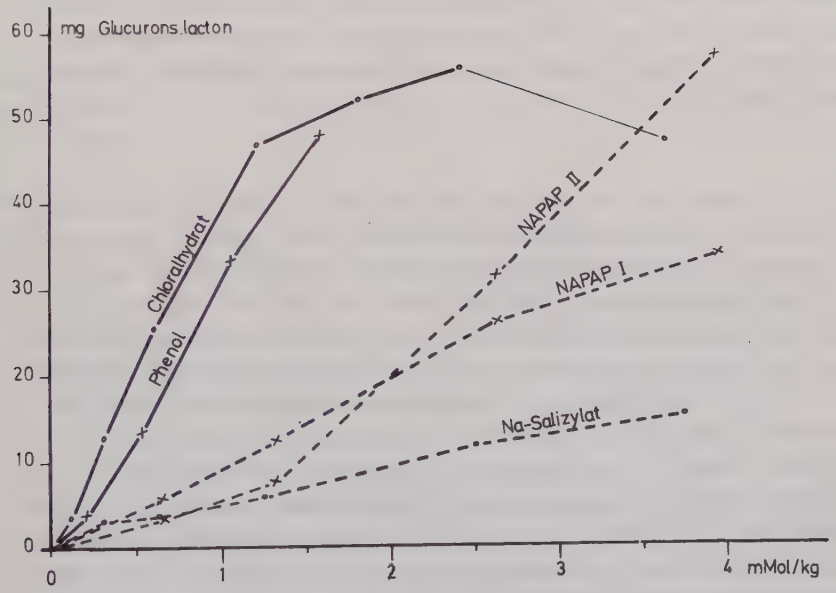

Abb. 6: Die Glucuronidausscheidung in $4\frac{1}{2}$ Stunden nach Belastung mit verschiedenen Substanzen ist in Abhängigkeit von der Dosis dargestellt. Damit die Kurven vergleichbar sind, ist die Dosis in mMol/kg angegeben. Die Ausscheidung nach Belastung mit NAPAP ist in zwei Kurven dargestellt: NAPAP I = Ausscheidung in Periode I (0-$4\frac{1}{2}$ Std.p.Inj.), NAPAP II = Ausscheidung in Periode II ($4\frac{1}{2}$ - 9 Std. p.Inj.)

Die Abb. zeigt die unterschiedlichen "Affinitäten" der auszuscheidenden Substanzen zum glucuronidierenden System. Nach Chloralhydrat-Belastung zeigt sich eine deutliche Erschöpfung der Glucuronidbildung.

Die Abb. 6 zeigt aber gleichzeitig, daß eine lineare Abhängigkeit der Glucuronidausscheidung von der Dosis in keinem Falle wirklich beobachtet wurde: Die Steigung nimmt entweder ab, als Zeichen der Erschöpfbarkeit des Systems (Chloralhydrat und in den höchsten Dosierungen auch Phenol und NAPAP), oder sie nimmt zu, als Zeichen einer vikariierenden Mehrausscheidung zur Kompensation der frühzeitig erschöpfbaren Sulfatbildung (Phenol und NAPAP), worauf weiter unten eingegangen wird.

Für eine Abnahme der Steigung bieten sich zwei Erklärungen an: Entweder zeigt sich darin eine echte Erschöpfung des Systems, so daß ein Maximum pro Zeiteinheit, im Fall des Chloralhydrat etwa zwischen 42 und 56 mg Glucuronsäure/4$\frac{1}{2}$ Stunden, erreicht wird. Oder die hohen Dosen bewirken eine toxische Schädigung des Ausscheidungsmechanismus. Gegen die Annahme einer toxischen Schädigung lassen sich die wiederholten Beobachtungen anführen, daß schwerste Leberschäden, sowohl experimentelle Tetrachlorkohlenstoffvergiftungen (allerdings nicht in der akuten Form) oder Allylalkoholvergiftungen, als auch schwere Leberzirrhosen, das glucuronidierende System unbeeinflußt lassen. (KÜHNEL 1963[22]; BECK et al. 1967[2]; Kunin et al. 1959[23]). Da ferner in der Literatur keine schweren Leberschädigungen durch Chloralhydrat bekannt sind, ist eine echte Auslastung des Systems wahrscheinlicher.

Es bleibt dann allerdings offen, ob der limitierende Faktor die Aktivität der Glucuronyltransferase oder die Menge der verfügbaren UDP-Glucuronsäure ist. Auch SPRÖGGEL (1962)[37] und KÜHNEL (1963)[22] vermuten eine Auslastung des glucuronidierenden Systems, da bei Mäusen die Dauer der Chloralhydratnarkose durch gleichzeitige Gabe von Na-Salizylat signifikant verlängert wird. Durch Glucose und Fructose als Vorstufe der Glucuronsäuresynthese wurden keine Änderungen der Narkosezeit und der Glucuronidausscheidung erreicht. Dagegen wird von anderen Autoren eine Förderung der Glucuronidausscheidung durch Glucose, Fructose, Glycerin (JÜDHOFF 1952[40]; BECK und RICHTER 1962[3]), Brenztraubensäure und Milchsäure (PACKAM and BUTTLER 1952[28]) behauptet. Den Glucoseeffekt konnten LIPSCHITZ und BUEDING (1939)[26] an Leberschnitten nicht nachweisen. Die Frage nach dem limitierenden Faktor ist auf Grund der widersprechenden Angaben ungelöst.

Für eine Begrenzung der Glucuronidbildung sprechen auch die Ergebnisse der Kombinationsversuche (S. 17), in denen der erwartete Wert umso weniger erreicht wurde, je höher er lag.

Warum bei der niedrigen Glucuronidausscheidung nach Belastung mit Na-Salizylat ein Abfall der Steigung eintritt, ist nicht klar. Diese Kurve zeigt auch nicht annähernd so deutlich die Erreichung eines Maximums.

Die Phenolkurve zeigt zunächst eine deutliche Zunahme der Steigung (s. auch Abb. 7 und Tab 3 und Tab 8 auf S. 26). Die Erklärung ist darin zu suchen, daß die Sulfatausscheidung nach Phenolbelastung deutlich einem Maximum zustrebt. Der Vergleich Glucuronid und Sulfat nach Phenolbelastung ist in Abb. 7 dargestellt. Es muß angenommen werden, daß die Glucuronidbindung doch so leistungsfähig ist, einen Teil der ausfallenden Sulfatbildung vikariierend zu übernehmen.

Daß die Sulfatbildung sehr bald erschöpft ist und praktisch nur von der endogen verfügbaren Schwefelsäure abhängt, nicht aber vom Körperspiegel der auszuscheidenden Substanz, haben auch BRAY und Mitarbeiter (1952)[5] gezeigt, die die Ausscheidung verschiedener Phenole beim Kaninchen untersucht haben. Dabei ist die Menge des ausgeschiedenen Estersulfates auch unabhängig von der Art des Phenols, obwohl nach GREGORY (1961)[18] die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Übertragung des Sulfats auf verschiedene Phenole in vitro verschieden und wahrscheinlich abhängig vom pk-Wert der phenolischen OH-Gruppe ist (GREGORY and LIPMAN 1957[19]). Das ist ein Beweis dafür, daß die Erschöpfung der Estersulfatbildung ausschließlich eine Eigenschaft des ausscheidenden Systems ist. Ob die Ursache ein Mangel an anorganischem Sulfat oder aktiviertem Sulfat in Form des PAPS ist, ist nicht eindeutig. Nach v. GREVE-DIERFELD (1967)[20] bewirkt die Gabe von anorganischem Sulfat keine Erhöhung der Estersulfatausbeute nach Phenolbelastung (s. Abb. 2) und NAPAP-Belastung in niedriger Dosierung (100 mg/kg). Bei höherer NAPAP-Dosierung (400 mg/kg) wird Na-Sulfat zur Veresterung benutzt. Auch d-l-Methionin bewirkt eine Erhöhung des Estersulfats im Urin nach Phenolbelastung. Auch BRAY et al. (1952)[5] konnten einen Anstieg des Estersulfates durch Sulfatvorstufen wie l-Cystin oder Na-Sulfat erreichen. Korrespondierend fällt dann die Ge-

samtausbeute an Glucuronid ab. Das Maximum der Sulfatausscheidung liegt beim Kaninchen nach BRAY (1952_2)[5] im Durchschnitt bei 4,5 mg SO_3 kg/Std. Das stimmt etwa mit den von v.GREVE-DIERFELD an Ratten gemessenen Werten dieser Arbeit überein: Ca. 10 mg Estersulfat/Tier/$4\frac{1}{2}$ Std., entsprechend 7,4 mg/kg/Std., da das mittlere Gewicht der Tiere 300 g betrug.

Nach den Untersuchungen von BRAY et al. (1952_1)[4] ist die Glucuronidausscheidung nach Phenolbelastung linear abhängig vom Körperspiegel der auszuscheidenden Substanz. Es gibt keine Anzeichen für eine Erschöpfung des Systems. Auch in dieser Arbeit war bei Belastung mit Phenol kein Hinweis auf die Erreichung eines Glucuronidmaximums gegeben. Das widerspricht aber nicht dem Ergebnis, das nach Chloralhydratinjektion gefunden wurde. Erstens lagen die Werte bei höchster Phenoldosis eben erst im Bereich des vermuteten Maximums. Zweitens spricht die Tatsache, daß die frühe Erschöpfung der Sulfatausscheidung nur zum Teil durch die Glucuronidausscheidung kompensiert wird (s. Tab 3a und Tab 8), eher zugunsten der Annahme, daß auch die Glucuronidmenge erschöpfbar ist. Allerdings ist zu erwarten, daß diese Kompensation nicht nur der Glucuronidbildung zufällt, sondern auch eventuellen anderen Ausscheidungsmechanismen für Phenol (zum Beispiel wird Phenol auch als freie Substanz ausgeschieden und hydroxyliert (PARKE and WILLIAMS 1953[29]), obwohl diese nur wenig ins Gewicht fallen. Das verschiedene Verhalten der Sulfat- und Glucuronidausscheidung nach Phenolbelastung wird durch Abb. 7 veranschaulicht, der außerdem zu entnehmen ist, welche Konjugatmenge welcher Menge Phenol entspricht. Die Ausscheidung des Phenol als Glucuronid, Sulfat und Gesamtkonjugat in Prozent der Dosis zeigt die folgende

Tabelle 8:

Dosis mg/kg		% als Gluc.	% als Sulf.	% als Konj.	total
20	s.c.	29,9	79,5	109,4	eigene Werte
50	s.c.	47,5	51,4	98,9	"
100	s.c.	58,9	31,0	89,9	"
150	s.c.	56,5	19,3	75,8	"
125-250	p.o.	70	19	89	PORTEOUS and WILLIAMS 1949[31]
50-60	p.o.	50	45		PARKE and WILLIAMS 1953[29].

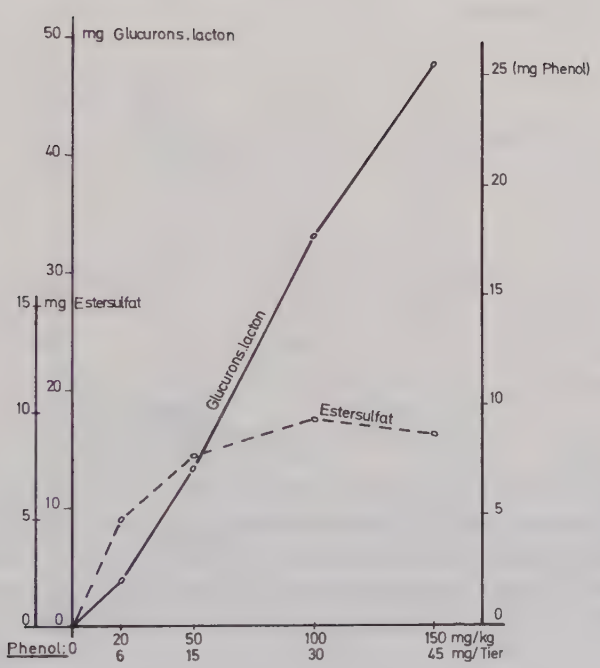

Abb. 7: Das unterschiedliche Verhalten der Sulfat- und Glucuronidbildung (in $4\frac{1}{2}$ Stunden) nach Belastung mit Phenol: Deutliche Erschöpfung der Sulfatausscheidung, die zunächst die Glucuronidbildung übertrifft, dann aber zurückbleibt. Die Glucuronidbildung zeigt keine Sättigung, zunächst sogar zunehmende Steigung der Kurve. Die Maßstäbe für Sulfat und Glucuronid stehen im äquimolaren Verhältnis zueinander, ebenso der rechts gezeigte Maßstab, von dem die der Konjugatmenge jeweils entsprechende Phenolmenge abzulesen ist.

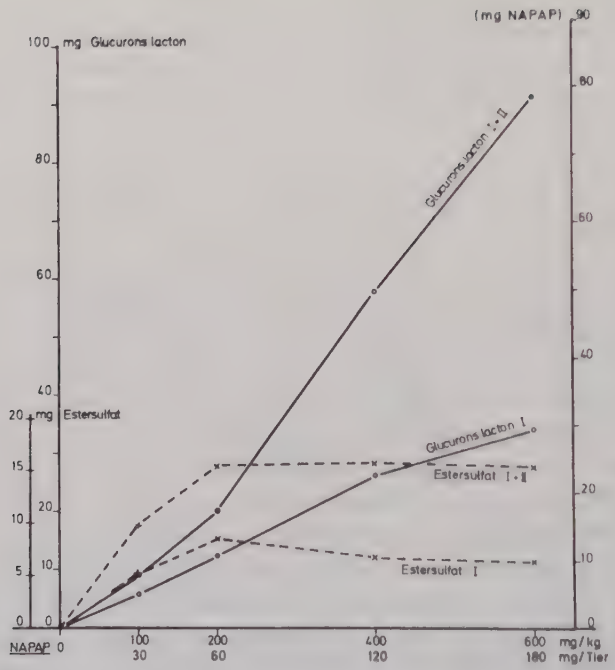

Abb. 8: Das unterschiedliche Verhalten der Sulfat- und Glucuronidbildung nach Belastung mit NAPAP: Deutliche Erschöpfung der Sulfatausscheidung, die durch die Glucuronidbildung anfangs zum Teil kompensiert wird (vgl. Abb. 7). Die Maßstäbe für Sulfat, Glucuronid und NAPAP stehen zueinander in äquimolaren Verhältnis. I = Ausscheidung in $4\frac{1}{2}$ Stunden, I+II in 9 Stunden nach Injektion.

Das entsprechende Verhalten nach Belastung mit NAPAP ist in Abb. 8 und Tab 9 dargestellt.

Tabelle 9:

mg/kg	Periode	% als Glucur.	% als Sulfat	% als Konjugat total
100	I	16,6	26,9	43,5
200	I	17,7	21,8	39,5
400	I	18,8	8,6	27,4
600	I	16,2	5,5	21,7
100	I+II	26,3	50,2	76,5
200	I+II	28,8	39,2	68,0
400	I+II	41,4	20,1	61,5
600	I+II	43,5	13,1	56,6

Auch hier zeigt sich eine deutliche Abnahme der prozentualen Ausscheidung als Sulfat, d.h. eine Erschöpfung des sulfatbindenden Systems und eine Zunahme der prozentualen Glucuronidausscheidung, die aber zur Kompensation des Sulfatmangels nicht ausreicht, so daß die Ausscheidung als Gesamtkonjugat prozentual ebenfalls abnimmt.

Die Kombinationsversuche zeigen, daß die Bildung des Phenolsulfatesters durch gleichzeitige Gabe von Na-Salizylat gehemmt wird (s.Tab. 7). Die Sulfatmenge ist in diesen Fällen etwa so hoch, wie nach Belastung mit Salizylat allein, d.h. gegenüber dem Normalwert praktisch nicht erhöht, so daß eine nahezu vollständige Hemmung der Veresterung anzunehmen ist. Es bleibt offen, ob das Salizylat die Bereitstellung des PAPS hemmt, indem es z.B. in den energieliefernden Stoffwechsel eingreift. (Nach CHARNOCH et al. 1961[9] erhöht eine Gabe von 30 mg Salizylat/100 g Körpergewicht p.o. bei Ratten den O_2-Verbrauch um 30-40 % innerhalb der ersten 4 Stunden). Da Salizylsäure eine phenolische OH-Gruppe hat, ist es auch denkbar, daß eine Blockierung der Sulfokinase, die Sulfat auf Phenole überträgt, stattfindet.

Es gibt in dieser Arbeit Hinweise dafür, daß eine Übertragung von Glucuronid in verschiedenen Organen (Leber und Niere) stattfindet. Es

fiel auf, daß bei einigen Tieren, bei denen aus unbekannten Gründen die Glucuronidmenge im Harn weit unter dem Durchschnittswert lag, eine vermehrte Menge an Galleglucuronid gefunden wurde (S. 8, Tab 2b und S. 13, Tab 3b). Zweitens sei an die starke Bildung von Galleglucuronid nach Belastung mit NAPAP erinnert (S. 14 und Tab 5). Und drittens scheint eine starke Galleglucuronidausscheidung einen Mangel an Harnglucuronid in den Kombinationsversuchen zu kompensieren. Es gibt in der Literatur mehrere Hinweise auf Glucuronidbildung in verschiedenen Organen, die zum Teil an Gewebsschnitten geprüft wurden. (DUTTON 1961[14]; DUTTON and STORY 1954[15]; BECK und RICHTER 1962[2] und dort zitiert: SPERBER 1947[36]; STEVENSON and DUTTON 1962[38]). Besonders hervorgehoben werden Leber, Niere und Intestinalmucosa. Außerdem soll die Ausscheidung der konjugierten Glucuronide im Harn nicht nur über glumeruläre Filtration, sondern auch über tubuläre Sekretion führen (SPERBER 1947[36]), wie z.B. vom Chloramphenicol behauptet wird (KUSCHINSKI 1966[24]). Es ist natürlich auch denkbar, daß nicht die Glucuronsäureübertragung in verschiedenen Organen für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich Harn- und Galleglucuronid verantwortlich ist, sondern daß das Maximum der tubulären Sekretion auf die Harnglucuronidmenge limitierend wirkt und der Überschuß zur Leber zurücktransportiert und dort ausgeschieden wird. Dafür sprechen insbesondere die Kombinationsversuche (s.Tab 6b). Andererseits kann das tubuläre Maximum nicht der einzige begrenzende Faktor sein, da dann beim Chloralhydratversuch die Galleglucuronidausscheidung wenigstens eine teilweise Kompensationstendenz zeigen müßte. Wenn man nicht ein besonders niedriges tubuläres Maximum fur NAPAP-Glucuronid annehmen will, das durch eine vermehrte Ausscheidung in der Galle kompensiert würde, weist der NAPAP-Versuch am ehesten auf verschiedene konjugierende Systeme in Leber und Niere hin. Ein ähnliches Verhalten zeigt die Ausscheidung von Phenolphthalein beim Menschen, das in großer Menge als Phenolphthaleinglucuronid mit der Galle ausgeschieden wird, aber kaum im Urin (PEKANMÄKI and SALMI 1961[30]).

Tier Nr.	Periode	Galle: Glucuronsäure mg	Harn: mg Glucuronsäure	s_x	s_M	n	Minimum	Maximum	P-Wert und Signifikanz
44–55, 60–67 und 72–75	I	0,91		0,20	0,05	18	0,61	1,26	
	II	0,65		0,15	0,03	18	0,41	0,88	0,001+++
	I		2,01	0,60	0,15	17	1,15	2,96	
	II		1,19	0,65	0,16	17	0,10	3,09	0,001+++
errechnet	I+II	1,56					1,02	2,10	
	I+II		3,20				1,25	5,87	

T A B E L L E 1 :Glucuronidausscheidung in Galle und Harn bei unbehandelten Tieren

T A B E L L E 2

Tier-Nr.	Dosis mg/kg	Dosis mg/Tier	Periode	Galle: Glucuronsäure gesamt mg	Harn: Glucuronsäure gesamt mg	s_M	s_M	n	P-Wert und Signifikanz	mg Glucuronsäure abzüglich Normalwert	mg Chloralhydr.,als glucuronidierte Verbindung ausgesch.	% der Dosis,als glucuronidierte Verbindung	% der Dosis,als glucuronidierte Verb. in Galle+Harn
168-175	2o	6	I	1,1o		o,27	o,1o	8	o,o5 -	o,19	o,18	3,o	
					5,36	1,47	o,55	7	o,oo1+++	3,35	3,12	52,o	55,o
176-183	5o	15	I	1,71		o,28	o,11	7	o,oo1+++	o,8o	o,74	4,9	
					13,98	2,54	o,96	7	o,oo1+++	11,97	11,13	74,2	79,1
184-191	1oo	3o	I	2,91		o,42	o,15	8	o,oo1+++	2,oo	1,86	6,2	
					25,5o	2,28	o,81	8	o,oo1+++	23,49	21,84	72,8	79,o
192-199	2oo	6o	I	5,2o		3,12	1,1o	8	o,1o -	4,29	3,99	6,6	
					44,49	6,52	2,92	5	o,oo1+++	42,48	39,51	65,8	72,4
2oo-2o7 u. 252-259	3oo	9o	I	5,99		2,1o	o,56	14	o,5 -	5,o8	4,72	5,2	
					39,69	18,33	5,18	13	/	37,68	35,o5	38,9	44,1
	3oo+			4,82		2,94	1,o4	8	o,3 -	3,91	3,64	4,o	
					5o,37	9,o7	3,o2	9	o,2 -	48,36	44,98	49,9	53,9
21o-215 u. 26o-27o	4oo	12o	I	7,95		5,4o	1,5o	13	o,3 -	7,o4	6,55	5,5	
					44,49	27,56	8,31	11	o,5 -	42,48	39,51	32,9	38,4
	4oo+			5,98		4,83	1,61	9	o,5 -	5,o7	4,72	3,9	
					52,71	23,o5	7,68	9	/	5o,7o	47,15	39,3	43,2

131	600	180	I	2,09				1		1,44	1,34		
					46,86			1		45,77	42,56	23,6	
352–359	200	60	I+II	6,75		3,30	1,25	7	0,5 –	5,07	4,83	8,1	
					40,89	12,25	5,01	6	/	37,69	35,05	58,4	66,5
	200+		I+II	5,50		2,21	0,95	5	/	3,95	3,66	6,1	
					45,63	3,96	1,77	5	/	42,44	39,47	65,8	71,9

T A B E L L E 2 : Glucuronidausscheidung in Galle und Harn nach s.c. Injektion von Chloralhydrat

+ bedeutet: Die Mittelwerte dieser Reihe sind unter Auslassung extrem niedriger Harnwerte und dazugehöriger Gallewerte berechnet.

Tier-Nr.	Dosis mg/kg	Dosis mg/Tier	Periode	Galle: mg Glucuronsäure gesamt	Harn: mg Glucuronsäure gesamt	s_x	s_M	n	P-Wert und Signifikanz	mg Glucuronsäure abzüglich Normalwert	mg Phenol, als glucuronidierte Verbindg. ausgesch.	% der Dosis, als glucuronidierte Verbindung	% der Dosis, als glucuronidierte Verb. in Galle+Harn
216-223	20	6	I	1,50	5,24	0,51	0,19	7	0,001+++	0,59	0,32	5,3	
						0,86	0,30	8	0,001+++	3,23	1,71	24,6	29,9
224-231	50	15	I	1,27	15,08	0,18	0,07	7	/	0,37	0,19	1,3	
						1,88	0,77	6	0,001+++	13,07	6,93	46,2	47,5
240-251	100	30	I	3,15	33,11	1,35	0,41	11	0,005++	2,24	1,19	4,0	
						3,68	1,11	11	0,001+++	31,10	16,48	54,9	58,9
232-239	150	45	I	5,50	45,40	1,54	0,58	7	0,005++	4,59	2,43	5,4	
						8,59	3,04	8	0,001+++	43,39	23,00	51,1	56,5
312-319	100 + Na_2SO_4	30+)	I	3,66	29,76		0,24	8		2,75	1,46	4,9	
							1,77	8		27,66	14,66	48,9	53,8
320-327	100 + Na_2SO_4	30++	I	4,35	29,37		0,85	7		3,44	1,82	6,1	
							3,74	7		27,27	14,45	48,2	54,3
344-350	100	30	I+II	5,14	36,70	1,10	0,49	5	0,02 +	3,58	1,90	6,3	
						2,53	1,03	6	0,1 –	33,50	17,89	59,6	65,9

TABELLE 3: Glucuronidausscheidung in Galle und Harn nach s.c. Injektion von Phenol

+) 8ml 0,05 n Na-Sulfat per os + 1 ml 0,05 n Na-Sulfat s.c.

++) 42 mg Na-Sulfat s.c.

TABELLE 3a:

Tier Nr.	Dosis mg/kg	Dosis mg/Tier	Periode	Harn: mg Estersulfat gesamt	s_x	s_M	n	P-Wert und Signifikanz	mg Estersulfat abzüglich Normalwert	mg Phenol, als Sulfat ausgeschieden	% der Dosis als Sulfat	% der Dosis, als Sulfat + Glucuronid gesamt
216-223	2o	6	I	6,47	1,16	o,44	7	o,oo1+++	4,97	4,77	79,5	1o9,4
224-231	5o	15	I	9,53	1,19	o,45	7	o,oo1+++	8,o3	7,71	51,4	98,9
24o-246	1oo	3o	I	11,2o	1,22	o,46	7	o,o5 -	9,7o	9,31	31,o	89,9
232-239	15o	45	I	1o,49	1,33	o,47	8	/	8,99	8,63	19,3	75,7
TABELLE 4a:												
272-279	5o	15	I	3,52	1,o8	o,~~84~~	6	o,oo1+++	2,o2	3,29	21,9	4o,7
28o-287	1oo	3o	I	2,29	o,77	o,27	8	o,o2+	o,79	1,29	4,3	15,4
288-295	2oo	6o	I	2,11	o,4o	o,14	8	oo,o5 -	o,61	o,99	1,7	1o,6
296-3o3	4oo	12o	I	3,29	1,67	o,63	7	o,oo1+++	1,79	2,92 ~~4,33~~	2,43 ~~e,9~~	11,3 ~~9,8~~
3o4-31o	6oo	18o	I	2,28	1,o6	o,4o	7	o,o5 -	o,78	1,27	o,7	8,4

Tabellen 3a und 4a : Estersulfatausscheidung im Harn nach s.c.-Injektion von Phenol (3a), bzw. Na-Salizylat. Die Signifikanzangaben in Tab. 4a beziehen sich alle auf den Vergleich der Sulfatwerte mit der Basissulfatausscheidung.

Tier-Nr.	Dosis mg/kg	Dosis mg/Tier	Periode	Galle: Glucuronsäure gesamt mg	Harn: mg Glucuronsäure gesammt	s_x	s_M	n	P-Wert und Signifikanz	mg Glucuronsäure abzüglich Normalwert	mg Na-Salizylat; als glucuronidierte Verbindg. ausgesch.	% der Dosis, als glucuronidierte Verbindung	% der Dosis, als glucuronidierte Verb. in Galle+Harn
272-279	5o	15	I	1,29		o,39	o,16	6	o,oo5++	o,38	o,35	2,3	
					4,73	o,51	o,21	6	o,oo1+++	2,72	2,47	16,5	18,8
28o-287	1oo	3o	I	1,68		o,44	o,16	8	o,2 –	o,77	o,7o	2,3	
					4,92	1,81	o,64	8	o,9 –	2,91	2,65	8,8	11,1
288-295	2oo	6o	I	1,6o		o,54	o,21	7	/	o,69	o,62	1,o	
					7,22	1,4o	o,5o	8	o,o2+	5,21	4,74	7,9	8,9
296-3o3	4oo	12o	I	3,65		1,38	o,52	7	o,oo5++	2,74	2,5o	2,1	
					1o,94	2,74	1,o3	7	o,oo5++	8,93	8,12	6,8	8,9
3o4-31o	6oo	18o	I	5,17		o,9o	o,4o	5	o,1o –	4,26	3,87	2,2	
					12,84	2,4o	1,o3	5	o,3 –	1o,83	9,86	5,5	7,7
328-335	4oo	12o	I+II	5,78		2,19	o,98	5	o,1 –	4,22	3,84	3,2	
					24,73	3,29	1,47	5	o,oo1+++	21,54	19,6o	16,3	19,5
336-343	2oo	6o	I+II	4,7o		1,58	o,6o	7	o,oo1+++	3,14	2,86	4,8	
					13,29	1,56	o,55	8	o,oo1+++	1o,1o	9,19	15,3	2o,1

T A B E L L E 4: Glucuronidausscheidung in Galle und Harn nach s.c.-Injektion von Na-Salizylat

T A B E L L E 5a:

Tier Nr.	Dosis mg/kg	Dosis mg/Tier	Periode	mg Estersulfat gesamt im Harn	s_M	s_M	n	F-Wert und Signifikanz	mg Estersulfat abzüglich Normalwert	mg NAPAP, als Sulfat ausgeschieden	% der Dosis als Sulfat	% der Dosis, als Sulfat + Glucuronid gesamt
478-485	100	30	I	6,74	1,76	0,62	8	0,001+++	5,24	8,07	26,9	43,5
			II	5,29	1,30	0,46	8	0,001+++	4,55	7,00	23,3	33,0
470-477	200	60	I	10,00	0,76	0,27	8	0,001+++	8,50	13.09	21,8	39,5 48,1
			II	7,51	1,30	0,46	8	0,005++	6,77	10,43	17,4	28,5
486-493	400	120	I	8,20	3,12	1,18	7	/	6,70	10,32	8,6	27,4
			II	9,71	5,17	1,95	7	0,10 –	8,97	13,81	11,5	34,1
498-505	600	180	I	7,92	2,69	1,02	7	/	6,42	9,89	5,5	21,7
			II	9,58	1,22	0,43	8	/	8,84	13,61	7,6	34,9

Tabelle 5a : Estersulfatausscheidung im Harn nach s.c.-Injektion von NAPAP.

TABELLE 5

Tiernummer	Dosis mg/kg	Dosis mg/Tier	Periode	Galle: mg Glucuronsäure gesamt	Harn: mg Glucuronsäure gesamt	s_x	$s_{\bar{x}}$	n	P-Wert und Signifikanz	mg Glucuronsäure abzüglich Normalwert	mg NAPAP, als glucuronidierte Verb. ausgeschieden	% der Dosis, als glucuronidierte Verbindung	% der Dosis, als glucuronidierte Verb. in Galle+Harn
478 - 485	100	30	I	3,52	5,08	1,90	0,72	7	0,001+++	2,71	2,33	7,8	16,6
						1,22	0,43	8	0,001+++	3,07	2,64	8,8	
			II	1,29	3,93	0,29	0,11	7	0,001+++	0,64	0,55	1,8	9,7
						1,58	0,56	8	0,001+++	2,74	2,36	7,9	
			I+II	4,91	9,01					3,35	2,88	9,6	26,3
										5,81	5,00	16,7	
470 - 477	200	60	I	6,00	9,29	1,44	0,51	8	0,02 +	5,09	4,38	7,3	17,7
						2,58	0,91	8	0,001+++	7,28	6,26	10,4	
			II	2,67	6,88	0,70	0,25	8	0,001+++	2,02	1,73	2,9	11,1
						1,64	0,58	8	0,005++	5,69	4,89	8,2	
			I+II	8,67	15,17					7,11	6,11	10,2	28,8
										12,97	11,15	18,6	
486 - 493	400	120	I	10,64	12,45	3,48	1,23	8	0,001+++	15,73	13,53	11,3	18,8
						7,49	2,83	7	0,3 -	10,44	8,98	7,5	
			II	11,24	22,16	2,80	0,99	8	0,001+++	10,59	9,11	7,6	22,6
						7,08	2,68	7	0,001+++	20,97	18,03	15,0	
			I+II	27,88	34,61					26,32	22,64	18,9	41,4
										31,41	27,01	22,5	

498 - 505	600	180	I	25,20		5,35	1,89	8	0,002+++	24,29	20,89	11,6	
					11,61	5,85	2,07	8	/	9,60	8,26	4,6	16,2
			II	22,69		4,64	1,64	8	0,001+++	22,04	18,95	10,5	
					36,35	5,18	1,83	8	0,001+++	35,16	30,24	15,8	27,3
			I+II	47,89						46,33	39,84	22,1	
					47,96					44,76	38,50	21,4	43,5

TABELLE 5 : Glucuronidausscheidung in Galle und Harn nach s.c. Injektion von NAPAP
Die Ausscheidung wurde bei jedem Tier über 2 x $4\frac{1}{2}$ Std. (I und II). Die Werte für 9 Std. (I+II) wurden als Summe berechnet.

Tier Nr.	Substanz und Dosis (mg/kg)	Periode	mg Glucuronsäure in Galle + Harn abzüglich Normalwert	errechneter Wert	% des errechneten Wertes
360-371	Chloralhydr. 200	I	67,46	80,11	84,2
	+ Phenol 100	I+II	89,02	84,72	105,1
373, 375 u. 450	Chloralhydr. 200 + Na-Saliz. 400	I	53,93	58,44	92,3 96,5
		I+II	70,83	73,40	
384-387+ 464-468	Na-Saliz. 200	I	40,66	39,24	104,9
	+ Phenol 100	I+II	56,77	50,32	112,8
388-395u. 455-459	Chloralhydr. 200 + Na-Saliz. 200+ Phenol 100	I	62,96	86,01	73,2
		I+II	95,08	97,96	97,1

T A B E L L E 6a : Glucuronidausscheidung in Galle + Harn verglichen mit den entsprechenden errechneten Werten. (Vergl. Tab. 6).

Tier Nr.	Substanz und Dosis (mg/kg)	Periode	Harn: mg Estersulfat	s_M	n	mg Estersulfat abzüglich Normalwert
360-371	Chloralhydr. 200	I	10,52	0,43	9	9,02
	+ Phenol 100	I+II	4,64	0,35	9	3,90
384-387u. 464-468	Na-Saliz. 200	I	3,55	0,40	8	2,05
	+ Phenol 100	I+II	2,60	0,20	8	1,86
388-395u. 455-459	Chloralhydr. 200 + Na-Saliz. 200	I	2,91	0,39	8	1,41
	+ Phenol 100	I+II	2,43	0,30	8	1,69

T A B E L L E 7: Estersulfatausscheidung im Harn nach s.c. Injektion mehrerer Substanzen gleichzeitig. Nach 100 mg Phenol/kg alleine wurden 11,20 , bzw. nach Abzug des Normalwertes 9,70 mg Estersulfat in Periode I ausgeschieden.

T A B E L L E 6

Tier Nr.	Substanz und Dosis (mg/kg)	Periode	Galle: Glucuronsäure gesamt mg	Harn: Glucuronsäure gesamt mg	s_M	n	mg Glucuronsäure abzüglich Normalwert	errechneter Wert	% des errechneten Wertes
360 — 371	Chloralhydr. 200 + Phenol 100	I	9,20	61,18	1,20 5,00	8 10	8,29 59,17	6,53 73,58	126,9 80,4
		II	1,50	21,90	0,31 2,47	8 10	0,85 20,71		
		I+II	10,70	83,08			9,14 79,88	8,78 75,94	104.1 105,2
373, 375 u. 450	Chloralhydr. 200 + Na-Saliz. 400	I	11,63	45,23	0,58 9,77	3 3	10,71 43,22	7,03 51,41	152,3 84,1
		II	4,52	14,22	0,43 0,23	3 3	3,87 13,03		
		I+II	16,15	59,45			14,58 56,25	9,42 63,98	154,8 87,9
384-387 und 464-468	Na-Saliz. 200 + Phenol 100	I	11,80	31,78	0,61 3,70	9 9	10,89 29,77	2,93 36,31	371,7 82,0
		II	2,99	14,96	0,14 1,13	9 8	2,34 13,77		
		I+II	14,79	46,74			13,23 43,54	6,72 43,60	196,9 99,9

388-395 und 455-459	Chloralhydr.2oo + Na-Saliz. 2oo + Phenol 1oo	I	16,34	49,54	o,98 6,13	7 7	15,43 47,53	7,22 78,79	213,7 6o,3
		II	5,o7	28,89	o,41 2,82	7 7	4,42 27,7o		
		I+II	21,41	78,43			19,85 75,23	11,92 86,o4	166,6 87,4

T A B E L L E 6 : Glucuronidausscheidung in Galle und Harn nach s.c.Injektion mehrerer Substanzen gleichzeitig. Messung über 2 x $4\frac{1}{2}$ Std. (I und II) Die gemessenen Werte werden verglichen mit den aus den vorangegangenen Versuchen als Summe errechneten.

VI. Zusammenfassung

1. An Ratten wird die Ausscheidung von Glucuronid und Estersulfat *) in Galle und Harn nach einmaliger subcutaner Injektion verschiedener Substanzen in ihrer Abhängigkeit von der Dosis gemessen.

2. Nach Belastung mit Chloralhydrat ist die Glucuronidausscheidung nur bis zur Dosis 200 mg/kg Körpergewicht von der Dosis abhängig. Bei weiterer Erhöhung der Dosis werden keine signifikanten Änderungen mehr festgestellt. Das erreichte Maximum liegt zwischen 42 und 56 mg Glucuronid in $4\frac{1}{2}$ Stunden in Galle und Harn zusammen.

3. Eine Zunahme der Estersulfatausscheidung tritt nach Belastung mit Phenol oder NAPAP auf. In beiden Fällen wird ein Maximum von nur etwa 10 mg Estersulfat in $4\frac{1}{2}$ Stunden im Harn erreicht. Die baldige Erschöpfung der Estersulfatbildung wird durch vermehrte Glucuronidbildung nur zum Teil kompensiert.

4. Die Estersulfatbildung nach Phenolbelastung wird durch gleichzeitige Gaben von Na-Salicylat gehemmt. Eine kompensatorische Zunahme der Glucuronidbildung konnte nicht beobachtet werden.

---

*) Die Sulfatbestimmungen wurden von Herrn Dr. v. Greve-Dierfeld durchgeführt.

LITERATUR

1. ALPEN, MANDEL, RODWELL u. SMITH 1951: The Metabolism of ^{14}Carboxyl Salicylic Acid in the Dog and the Man: J. Pharm. and Exper. Ther. 102, S. 150-155.

2. BECK, KÜHN u. NOURAIE 1967: Zur Frage der Glucuronidbildung bei tox. Schädigungen der Leber. Acta hepatosplenolog. 14, S. 280-289.

3. BECK u. RICHTER 1962: Über die Wirkung von Glucose und Fructose auf die Glucuronidbildung beim gesunden Menschen. Klin. Wchschr. 40, S. 75-80.

4. BRAY, HUMPHRIS, THORPE, WHITE and WOOD 1952$_1$: Kinetic Studies of the Metabolism of Foreign Organic Compounds 3. The Conjugation of Phenols with Glucuronic Acid. Biochem. Journ. 52, S. 416-419.

5. BRAY, HUMPHRIS, THORPE, WHITE and WOOD 1952$_2$: Kinetic Studies of the Metabolism of Foreign Organic Compounds 4. The Conjugation of Phenols with Sulphuric Acid. Biochem. Journ. 52, S. 416-423.

6. BRAY, RYMAN and THORPE 1948: The Fate of Certain Organic Acids and Amides in the Rabbit 5. o-and m-Hydroxybenzoic Acids and Amides. Biochem. Journ. 43, S. 561-567.

7. BRODIE and AXELROD 1948: The Fate of Acetanilide in Man J.Pharm. and Experi. Ther. 94, S. 29-38.

8. BUTLER; Journ. Pharmacol. exper. Ther. 97, S. 84.

9. CHARNOCH, OPIT and HETZEL 1961: Electrolyte distribution in Rats Following Salicylates. Metabolism 10, S. 874-882.

10. DEBRAY, de la TOUR, VAILLE, ROZE et SOUCHARD 1962: Contribution à l'etude de la sécrétion biliaire et pancréatique externe chez le rat. J.Physiol. (Paris) 54, S. 459-499, ref. in Ber. Ges. Physiol. u. exp. Pharm. (Rona) 254 (1964), S. 237.

11. DISCHE 1947: A new Specific Color Reaction of Hexuronic Acids. J. Biol. Chem. 167, S. 189.

12. DOCUMENTA GEIGY Wissenschaftliche Tabellen 1955 s.R.Geigy AG Basel.

13. DUTTON 1959: Glucuronide Synthesis in Foetal Liver and other Tissues. Bioch. Journ. 71, S. 141-147.

14. DUTTON 1961: Glucuronid Conjugation. First Internat. Pharmacolog. Meeting Vol. 6, S. 39.

15. DUTTON and STOREY 1954: Uridine Compounds in Glucuronic Acid Metabolism Bioch. Journ. 57, S. 275.

16. FREUDENBERG 1962: Grundriß der medizinischen Statistik. Friedr. K. Schattauer-Verlag Stuttgart.

17. GOODMAN and GILMAN 1958: The Pharmacological Basis of Therapeutics. The Macmillan Comp. New York, S. 281-307.

18. GREGORY 1961: Sulfat Conjugation. First Internat. Pharmacolog. Meeting Vol 6, S. 55.

19. GREGORY and LIPMAN 1957: The Transfer of Sulfate amons Phenolic Compounds with 3'-5'-Diphosphoadenosine and Coenzyme. J.Biol. Chem. 229, S. 1081-1090.

20. v. GREVE-DIERFELD 1967: Unveröffentlichte Arbeit am Pharmakolog. Institut der Univ. Marburg.

20 a. ISSELBACHER, CHRABAS and QUINN 1962: The Solubilization and Partial Purification of a Glucuronyl Transferase from Rabbit liver Microsomes. J. Biol. Chem. 237, S. 3033-3036.

21. KAPP and COBURN 1942: Urinary Metabolism of Sodium Salicylates. J. Biol. Chem. 145, S. 549.

22. KÜHNEL 1963: Zur Frage der Belastbarkeit der Glucuronidkupplung. Dissertation Marburg.

23. KUNIN, GLAZKO and FINLAND 1959: Persistence of Antibiotics in Blood of Patients with Acute Renal Failure II. Chloramphenicol and its Metabolic Products in the Blood of Patients with Severe Renal Disease or Hepatic Cirrhois. J.clin.Invest. 38, S. 1489-1508 (zit. bei REMMER 1966 (32).

24. KUSCHINSKY u. LÜLLMANN 1966: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. G. Thieme-Verlag Stuttgart 2. Aufl., S. 269.

25. LEUTHARDT 1960: Biochemische Grundlagen der Entgiftungsreaktionen. Arch. exp. Pathol. Pharmacol.

26. LIPSCHITZ u. BUEDING 1939: Mechanism of the Biological Formation of Conjugated Glucuronid Acids. J. Biol. Chem. 129, S. 333.

27. MILLS, LOCKHEAD and SMITH 1958: Uridine Pyrophosphoglycosyl Compounds and the Formation of Glucuronide by Isolated Enzyme Systems. Biochim. et biophys. Acta 27, S. 103-111.

28. PACKAM and BUTLER 1952: Studies of the Biological Synthesis of Glucuronides. J. Biol. Chem. 194, S. 349-357.

29. PARKE and WILLIAMS 1953: Studies in Detoxication, The Metabolism of ^{14}C-Phenol. Biochem. Journ. 55, S. 340.

30. PEKANMÄKI and SALMI 1961: The Glucuronide Conjugation of Phenolphthalein in Men. Ann. Med. exp. Fenn 39, S. 302-305, ref. in Ber.Ges.Physiol.exp. Pharmacol. 239 (1962), S. 35.

31. PORTEOUS and WILLIAMS 1949: The Metabolism of Benzene in Rabbit. Bioch. Journ. 44, S. 46.

32. REMMER 1966: Die Entgiftung der Pharmaka. DMW 91, S. 289.

33. ROBINSON and WILLIAMS 1956: Glucuronides of Salicylic Acid. Bioch. Journ. 62, S. 23 p-34.

34. SCHMID, R. 1960: Metabolic Basis of Interited Deseases (Hrsgb.: STANBURG, WYNGAARDEN u. FREDRICKSON), S. 226.

35. SMITH and WILLIAMS 1954: Studies in Detoxication. The Metabolism of Aliphatic Alcohols. The Glucuronic Acid Conjugation of Chlorinated and some unsaturated Alcohols. Bioch. Journ. 56, S. 618-621.

36. SPERBER 1947: zit. bei BECK und RICHTER 1962(3).

37. SPROGGEL 1962: Über die gegenseitige Beeinflußbarkeit der Entgiftung bei Arzneimittelkombinationen. Dissertation Marburg.

38. STEVENSON and DUTTON 1962: Glucuronide Synthesis in Kidney and Gastrointestinal Tract. Bioch. Journ. 82, S. 330-339.

39. STOREY and DUTTON 1955: Uridine Compunds in Glucuronic Acid Metabolism. Bioch. Journ. 59, S. 279-288.

40. SÜDHOFF 1952: Ein Beitrag zur Glucuronsäureentgiftung. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 290, S. 72-78.

41. SÜDHOFF 1954: Ein weiterer Beitrag zur Glucuronsäureentgiftung. Hoppe-Seylers Z. phys. Chem. 296, S. 267.

42. WILLIAMS 1959: Detoxication Mechanism. Chapman and Hall, London. Zud. Edition.

43. WILLIAMS 1961: Detoxication Mechanisms in vivo. First Internat. Pharmacol. Meeting Vol. 6, S. 1

Herrn Professor Schmid möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen für die Überlassung des Themas und für Rat und Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit, aber auch in menschlichen und persönlichen Belangen.

Herrn Professor Siess gilt mein Dank für die Übernahme des Correferates. Auch ihm sei für Ratschläge und hilfreiche Hinweise gedankt.

Ferner schulde ich Herrn Dr. von Greve-Dierfeld Dank für die lehrreiche Zusammenarbeit und für die Überlassung seiner unveröffentlichten Versuchsergebnisse, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Lebenslauf

Am 29. Juli 1939 wurde ich, Gerhard Gottfried Panke, als zweiter Sohn des Studienrates Gerhard Panke und seiner Ehefrau Ursula, geb. Schmidmann in Fürstenwalde a.d. Spree geboren. Von 1945 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Marburg a.d. Lahn und wurde anschließend in die Sexta des altsprachlichen Gymnasium Philippinum in Marburg aufgenommen. Von 1951 bis 1959 war ich Schüler des altsprachlichen Zweiges der Alten Landesschule, Gymnasium und Realgymnasium in Korbach/ Waldeck. Dort bestand ich im März 1959 die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1959 war ich Schüler der städtischen Musikakademie in Kassel und studierte anschließend vier Semester an der Akademie für Musik und darstellende Kunst in Wien.

Im Wintersemester 1961 immatrikulierte ich mich an der Philipps-Universität in Marburg zum Studium der Medizin. Alle für dieses Studium erforderlichen Prüfungen absolvierte ich in Marburg: die Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 27.10.1962, die Ärztliche Vorprüfung am 25.4.1964 und das Staatsexamen am 18.7.1967.

Meine Medizinalassistentenzeit begann ich am 1.10.1967 an der Medizinischen Universitätspoliklinik in Marburg. Seit 1.5.1968 bin ich als Medizinalassistent in der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung der Klinik St.Elisabeth in Marburg tätig.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Beckmann, Behrend, Berendes, Bickel, Bommer, Bücher, Braun-Falco, Brück, Buchholz, Dimroth, Dölle, Exner, Ganz, Gedigk, Golenhofen, Hamm, Hardewig, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Jacob, Kessler, Klingenberg, Knauff, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mahr, Mann, Martini, Mattes, Maurath, Marx, du Mesnil de Rochemont, Niessing, Oheme, Oehmig, Oksche, Petry, Petzoldt, Poetschke, Pots, Rodeck, Rohen, Salfeld, Sauer, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schölmerich, Schrappe, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Spiegelberg, Stender, Straub, Streicher, Stutte, Vogt, Walcher, Wendt, Würterle.